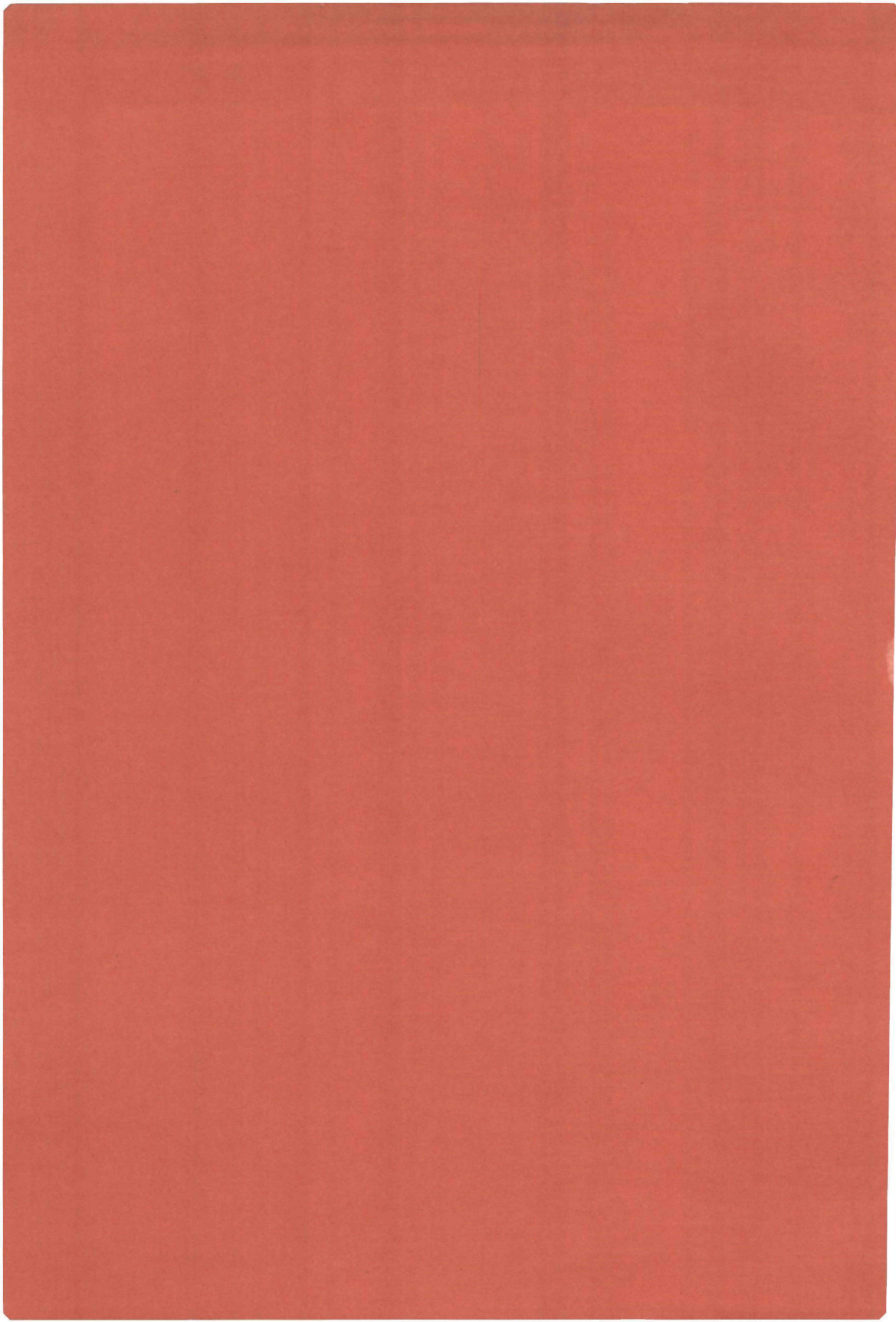


1790

# **DNA-SYNTHESIS IN PHYSARUM POLYCEPHALUM**

**P.A.T.J. WERRY**



"Het is voor een onderzoeker een goede ochtend-  
gymnastiek om dagelijks voor het ontbijt een  
geliefde hypothese te vermorzelen"

K. Lorenz

Promotor:

Prof.Dr. Ch.M.A. Kuiper

Co-referent:

Dr. F. Wanka

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE  
WISKUNDE EN NATUURWETENSCHAPPEN  
AAN DE KATHOLIEKE UNIVERSITEIT TE NIJMEGEN, OP GEZAG VAN  
DE RECTOR MAGNIFICUS PROF. MR. F. J. F. M. DUYNSTEE  
VOLGENS BESLUIT VAN HET COLLEGE VAN DECANEN  
IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN  
OP VRIJDAG 14 SEPTEMBER 1973  
DES NAMIDDAGS TE 4 UUR

door

Pieter Alphons Theodoor Joseph WERRY  
geboren te Heerlen



Aan mijn ouders

Voor Marie-Anne

Dit proefschrift is het resultaat van mijn werkzaamheden als wetenschappelijk medewerker van Dr. F. Wanka. Het onderzoek is geschied onder auspiciën van de stichting "Scheikundig Onderzoek in Nederland" (S.O.N.), met financiële ondersteuning van de stichting "Zuiver Wetenschappelijk Onderzoek" (Z.W.O.).

De faculteit der Wiskunde en Natuurwetenschappen en de afdeling Chemische Cytologie van de Katholieke Universiteit te Nijmegen dank ik voor de geboden faciliteiten. Met name wil ik bedanken: Ernie de Boer voor haar bekwame assistentie, Jean-Marie Vijverberg en W. Polak voor hun goede zorgen voor de ultracentrifuges en scintillatietellers, Diny Keijzers voor het accurate drukklaar maken van het manuscript en de heer J. Gerritsen voor de punctuele verzorging van de illustraties.

Een bijzonder woord van dank wil ik richten aan Marie-Anne Werry-Meisen voor haar kritische begeleiding bij het schrijven van dit proefschrift.



## INHOUD

DANKBETUIGING	6
LIJST VAN AFKORTINGEN	9
HOOFDSTUK I - INLEIDING	11
HOOFDSTUK II - MATERIAAL EN METHODEN	15
A Het kweken van <u>Physarum polycephalum</u>	15
B Het plaatsen van de experimenten in de kerncyclus	20
C Het radioactief labelen van de plasmodia	22
D Het homogeniseren en lyseren van de plasmodia	22
E Fenolextractie	23
F Sedimentatie- en dichtheidsanalyse	23
G Het meten van de radioactiviteit	24
H DNA- en eiwitbepaling	24
I Bijzondere chemicaliën	25
HOOFDSTUK III - DNA-SYNTHESE GEDURENDE DE KERNCYCLUS VAN <u>PHYSARUM</u>	
<u>POLYCEPHALUM</u>	26
A Inleiding	26
B Resultaten	26
Verdeling in S- en G2-fase	26
Dichtheidsanalyse van in S- en G2-fase gesynthetiseerd DNA	28
Sedimentatie-analyse van in S- en G2-fase gesynthetiseerd DNA	32
C Discussie	36
HOOFDSTUK IV - SEDIMENTATIEGEDRAG VAN DNA, PULSE-GELABELD TIJDENS DE	
S-PASE	38
A Inleiding	38
B Resultaten	40
C Discussie	44

HOOFDSTUK V - VERSCHILLENDE EFFECT VAN CYCLOHEXIMIDE OP DE SYNTHESE VAN CHROMOSOMAAL DNA EN NUCLEOLAIR EN MITOCHONDIRIAAL DNA	46
A Inleiding	46
B Resultaten	46
C Discussie	47
HOOFDSTUK VI - ENIGE BIOLOGISCHE EXPERIMENTEN OMTRENT HET LS-DNA	51
A Inleiding	51
B Resultaten	51
Synthese van LS-DNA in de kerncyclus	51
Stabiliteit van het LS-DNA in vivo	52
Effect van cycloheximide en ethidiumbromide op de synthese van het LS-DNA	55
C Discussie	58
HOOFDSTUK VII - EEN POGING TOT BIOCHEMISCHE KARAKTERISERING VAN HET LS-DNA	61
A Inleiding	61
B Resultaten	62
Radioactiviteit van LS-DNA is aan thymine gebonden	62
Zuivering van het LS-DNA	64
Karakterisering van het LS-DNA met behulp van enzymatische afbraak	71
Eigenschappen van LS-DNA na behandeling met pronase	74
C Discussie	76
SAMENVATTING	78
SUMMARY	81
LITERATUUR	85
CURRICULUM VITAE	89

# AFKORTINGEN

BSA	bovine serum albumine
C	Curie
CsCl	cesiumchloride
DNA	desoxyribonucleïnezuur
DNAse	desoxyribonuclease
dpm	desintegraties per minuut
EDTA	ethyleen diamine-tetraacetaat
<sup>3</sup> H-AdR	getritieerd adenosine
<sup>3</sup> H-TdR	getritieerd thymidine
NaDOC	natriumdesoxycholaat
PCA	perchloorzuur
RNA	ribonucleïnezuur
RNAse	ribonuclease
rpm	omwentelingen per minuut
SDS	natriumdodecylsulfaat
TCA	trichloorazijnzuur
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethaan



INLEIDING

Het DNA van eukaryotische organismen is in verschillende opzichten niet een homogene fractie, die zich onder alle omstandigheden als een eenheid gedraagt. Wat betreft de zweefdichtheid kan het DNA van de meeste organismen verdeeld worden in een hoofdfractie en een of meerdere fracties met een afwijkende zweefdichtheid: de satelliet-DNA-fracties. Ook op grond van de localisatie in de cel kan men het DNA in fracties verdelen: niet alleen in de kern bevindt zich DNA, maar ook in mitochondriën en chloroplasten kunnen aanzienlijke hoeveelheden DNA worden aangetroffen, zoals bij sommige lagere organismen is aangetoond. Een derde manier om DNA in te delen is te kijken naar de fase van de celcyclus, waarin het gesynthetiseerd wordt: in de S-fase vindt weliswaar synthese van de grootste hoeveelheid van het DNA plaats, maar ook in de andere fasen van de celcyclus wordt door vele organismen nog DNA gesynthetiseerd.

Juist op dit laatste fenomeen hebben de in dit proefschrift beschreven experimenten betrekking. Zij zijn uitgevoerd met als doel een antwoord te geven op de vraag: welke zijn de eventuele verschillen in structuur en regulatie van synthese tussen het DNA, dat uitsluitend gedurende de S-fase gesynthetiseerd wordt en dat waarvan de synthese niet beperkt is tot de S-fase.

Voor een dergelijk onderzoek is het van belang, dat het organisme, waarmee de experimenten worden uitgevoerd, van nature synchroon is wat betreft de S-fase en dat er ook buiten de S-fase nog een goed waarneembare DNA-synthese plaats vindt. De slijmzwam Physarum polycephalum voldoet volledig aan deze eisen. In de diploïde levensvorm komt dit organisme voor als een plasmodium, waarin op gezette tijden alle kernen zich synchroon delen en na die deling in alle kernen tegelijkertijd de S-fase begint (Guttes et al., 1961; Nygaard et al., 1960). Drie recent verschenen overzichtsartikelen (Cummins, 1968; Rusch, 1969; Rusch, 1970) geven de stand van zaken weer omtrent het onderzoek naar de biochemische en fysiologische processen die de totale groei van Physarum polycephalum begeleiden. De processen die optre-

den tijdens de groei van macroplasmodia en relevant zijn voor het te beschrijven onderzoek worden hier in het kort aangeduid:

### Mitose

Het opvallendste en wellicht daardoor voor het onderzoek belangrijkste synchrone proces in Physarum polycephalum is de kerndeling. De mate van synchroniteit kan het beste als volgt worden uitgedrukt: binnen drie minuten nadat de eerste kernen in het metafase-stadium gekomen zijn, komen 95 - 99% van de kernen in het metafase-stadium, wanneer althans de diameter van het plasmodium niet groter is dan acht cm (Guttes et al., 1961). Het tijdstip, waarop fysiologische processen zich in het plasmodium afspelen, of waarop experimentele ingrepen worden verricht, wordt over het algemeen gerelateerd aan het tijdstip waarop de metafase plaats vindt.

### DNA-synthese

Op grond van zijn localisatie en zweefdichtheid kan het DNA van Physarum polycephalum in drie fracties verdeeld worden: het kern-DNA (zweefdichtheid  $1,702 \text{ g/cm}^3$ ), het mitochondriaal DNA (zweefdichtheid  $1,686 \text{ g/cm}^3$ ) en het kern-satelliet-DNA (zweefdichtheid  $1,714 \text{ g/cm}^3$ ) (Braun en Evans, 1969; Holt en Gurney, 1969). De synthese van het kern-DNA vindt voornamelijk plaats gedurende een periode van anderhalf tot twee en een half uur onmiddellijk volgend op de mitose: de S-fase (Nygaard et al., 1960; Sachsenmaier, 1964; Braun en Evans, 1969; Holt en Gurney, 1969). Met behulp van autoradiografie na pulse-labeling in de G2-fase is door Guttes et al. (1969) aangetoond dat sommige kernen ook buiten de S-fase nog doorgaan met de aanmaak van kern-DNA. Deze kernen zijn evenwel qua structuur en grootte nogal afwijkend van de normale.

De aanmaak van mitochondriaal DNA gaat continu door tijdens de cyclus (Guttes et al., 1967; Braun en Evans, 1969; Holt en Gurney, 1969). Ook de synthese van het kern-satelliet-DNA verloopt continu door de cyclus met uitzondering evenwel van het eerste uur van de S-fase; daarin treedt geen aantoonbare synthese van het kern-satelliet-DNA op (Zellweger et al., 1972).

Het kern-satelliet-DNA bestaat uit de ribosomale genen (Zellweger et al., 1972)

en is gelocaliseerd in de nucleolus (Guttes en Guttes, 1969). Om deze reden wordt het kern-satelliet-DNA ter onderscheiding van de rest van het kern-DNA, dat chromosomaal DNA genoemd wordt, nucleolair DNA genoemd.

Door Braun en Will (1969) en Braun et al. (1965) is aangetoond, dat DNA, dat in een bepaalde periode van de S-fase van de ene kerncyclus gesynthetiseerd wordt, ook in andere kerncycli in diezelfde periode van de S-fase wordt aangemaakt. De genoemde auteurs kweekten gedurende een korte periode van de S-fase het plasmodium op medium waarin  $^3\text{H}$ -TdR, waardoor het DNA dat in die periode werd gesynthetiseerd met  $^3\text{H}$  gelabeld werd. Aan het begin van de volgende S-fase werd het plasmodium overgebracht op medium, waaraan  $^{14}\text{C}$ -broomdesoxyuridine was toegevoegd, zodat het nieuwe DNA een grotere zweefdichtheid kreeg. Op gezette tijden tijdens die tweede S-fase werd DNA geëxtraheerd en de zweefdichtheid bepaald. Het bleek nu, dat alleen vanaf de overeenkomstige periode in die tweede S-fase het DNA met de grotere zweefdichtheid ook  $^3\text{H}$ -gelabeld was.

Aangezien - zoals boven vermeld - de S-fase onmiddellijk volgt op de mitose, treedt in het plasmodium van Physarum polycephalum geen G1-fase op, zoals wel het geval is in de meeste organismen.

#### RNA- en eiwitsynthese

De literatuurgegevens over de RNA-synthese bij Physarum zijn niet alle met elkaar in overeenstemming. Sachsenmaier (1964) vond, dat de incorporatie van  $^3\text{H}$ -cytidine in RNA tijdens de mitose minimaal is, tot ongeveer vier uur na de mitose toeneemt tot een maximum en daarna geleidelijk weer afneemt tot het minimum tijdens de mitose. Andere resultaten werden verkregen door Mittermayer et al. (1964) en Braun et al. (1966). Na pulse-labeling met  $^3\text{H}$ -uridine vonden zij een piek van RNA-synthese tijdens de reconstructie van de nucleoli, dus samenvallend met de S-fase. Een tweede piek van RNA-synthese werd gevonden later in de G2-fase. Deze auteurs vinden dus een bifasische RNA-synthese in Physarum.

Het gehalte aan eiwit per plasmodium neemt gedurende de kern-cyclus constant toe, terwijl daarentegen de incorporatie van  $^3\text{H}$ -lysine een bifasisch karakter heeft. Lysine-incorporatie in eiwit vertoont een piek twee uur na de mitose en

een vier uur voor de mitose bij een cyclustuur van 11 uur. Dit incorporatieverloop is vrijwel parallel met dat van uridine-inbouw in RNA (Mittermayer et al., 1966).

De meeste geteste enzymen vertonen een constante en geleidelijke activiteitstoename gedurende de cyclus (Mittermann et al., 1970). Uitzonderingen zijn: glutamaatdehydrogenase (Mittermann et al., 1970), RNase I (Braun en Behrens, 1969), NAD-pyruvofosforylase (Solao en Shall, 1971) en thymidine-kinase (Sachsenmaier en Ives, 1965). De beide eerstgenoemde enzymen vertonen ongeveer midden tussen de mitosen in een stapsgewijze verdubbeling van de activiteit; van beide enzymen is ook aangetoond, dat deze toename van activiteit berust op synthese de novo. De twee laatstgenoemde enzymen vertonen een piek in hun activiteit tijdens de S-fase, waardoor een eventuele rol in de regulatie van de DNA-synthese gesuggereerd wordt. Van deze enzymen is niet bekend of de activiteitsvermeerdering berust op synthese de novo.

Mede ook door de eigenschappen die het gekozen organisme heeft, heeft zich de in het begin van dit hoofdstuk algemeen gestelde vraagstelling geconcretiseerd in de volgende punten:

In hoofdstuk III wordt nagegaan of ook in onze handen de indeling in S- en G2-fase bij het plasmodium van Physarum opgaat. Bovendien wordt nagegaan welke DNA-fracties in de verschillende fasen van de cyclus gesynthetiseerd worden. Hierbij zal een nog niet eerder beschreven DNA-fractie aan het licht treden.

In hoofdstuk IV zal een poging worden beschreven tot het verkrijgen van meer inzicht in het mechanisme van DNA-synthese gedurende de S-fase door middel van sedimentatie-analyse van pas-gerepliceerd DNA.

Hoofdstuk V handelt over het differentiële effect van de eiwitsynthese-remmer cycloheximide op de synthese van chromosomaal DNA enerzijds en de synthese van mitochondriaal en nucleolair DNA anderzijds.

In de hoofdstukken VI en VII tenslotte wordt beschreven hoe langs biologische respectievelijk biochemische weg geprobeerd is opheldering te krijgen over de structuur en de functie van het nieuw-gevonden DNA.



MATERIAAL EN METHODENA. Het kweken van Physarum polycephalum

In twee recente artikelen van de hand van Daniel en Baldwin (1964) en Guttess en Guttess (1964) zijn de methoden om Physarum polycephalum in het laboratorium te kweken en te handhaven uitvoerig beschreven. Voor de in dit werk beschreven experimenten is de vegetatieve levensvorm van Physarum polycephalum gebruikt: het plasmodium. In deze veelkernige, naakte protoplasma-massa treden op gezette tijden synchroon kerndelingen op. Zolang voldoende voedingsstoffen aanwezig zijn blijft het plasmodium doorgroeien. Raakt het substraat echter uitgeput, dan gaat het plasmodium over tot sclerotisatie. Het sclerotium kan de slechte periode overleven en weer tot een macroplasmodium uitgroeien als de omstandigheden weer gunstig geworden zijn.

In ons laboratorium wordt Physarum polycephalum gekweekt als microplasmodia. Deze microplasmodia verkrijgt men door een macroplasmodium over te brengen in een kolf met vloeibaar medium en het te fragmenteren door de kolf te schudden. Door de kolf te blijven schudden - hetgeen ook voor de doorluchting noodzakelijk is - krijgen de microplasmodia geen kans tot grotere plasmodia uit te groeien. Op deze wijze is de cultuur van Physarum polycephalum gemakkelijk door overenting te handhaven.

De voor de experimenten te gebruiken macroplasmodia werden verkregen door een groot aantal microplasmodia te laten coalesceren. Evenals de macroplasmodia kunnen microplasmodia door bijvoorbeeld voedselgebrek overgaan in sclerotia. Deze zogenaamde microsclerotia kunnen zeer lange tijd bewaard worden zonder dat ze hun groeivermogen verliezen. Tot op heden hebben alle onderzoekers, die met behulp van Physarum polycephalum fysiologische en moleculair-biologische problemen hebben trachten op te lossen, van de door Daniel en Baldwin (1964) en Guttess en Guttess (1964) beschreven methoden gebruik gemaakt. Afwijkingen betreffen alleen de praktische uitvoering van de methode, en daarom volgt hier een

exacte beschrijving van het kweken van Physarum op ons laboratorium.

Tabel 1. Samenstelling van het groeimedum voor Physarum polycephalum naar Daniel en Baldwin (1964).

Component	Concentratie (g/100 ml)
Trypton	1,0
Gistextract	0,15
Glucose (watervrij)	1,0
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,20
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,06
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,06
$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,006
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,0084
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0034
Citroenzuur	0,35
Haematine	0,0005

#### Samenstelling en aanmaak van het groeimedum

De samenstelling van het door Daniel en Baldwin (1964) semigedefinieerd genoemd groeimedum is gegeven in tabel 1. Een chemisch gedefinieerd medium is ook bekend, maar werd niet door ons toegepast. De ingrediënten van het semigedefinieerd medium worden als droge stof of als voorraadoplossing in de koelcel ( $4^\circ\text{C}$ ) bewaard. De voorraadoplossingen zijn:

- a) 40,0 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  per 200 ml  $\text{H}_2\text{O}$
- b) 20,0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  per 200 ml  $\text{H}_2\text{O}$
- c)  $\left. \begin{array}{l} 24,0 \text{ g } \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \\ 3,2 \text{ g } \text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} \\ 1,4 \text{ g } \text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \end{array} \right\}$  per 200 ml  $\text{H}_2\text{O}$

d) 0,025 g haemine per 125 ml 0,5% NaOH.

De aanmaak van het medium gaat als volgt: In ongeveer 700 ml gedestilleerd water worden achtereenvolgens opgelost: 8 g trypton, 8 g glucose, 1,2 g gist-extract, 0,048 g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  en 2,8 g citroenzuur. Nadat deze oplossing helder geworden is worden nog toegevoegd: 2,4 ml opl. a, 16 ml opl. b en 4 ml opl. c. Het volume wordt nu met gedestilleerd water op 800 ml gebracht, waarna de pH met 1 N NaOH op 4,5 wordt gebracht. Nu wordt gedestilleerd water toegevoegd tot het volume 880 ml is en de zo verkregen oplossing wordt verdeeld in porties van 22 ml over 40 erlenmeyers van 500 ml inhoud. De kolven worden afgesloten met een wattenprop en een aluminium cap en geautoclaveerd gedurende 20 minuten bij een druk van  $0,5 \text{ kg/cm}^2$  en een temperatuur van  $116^\circ\text{C}$ . Door het steriliseren verdampt ongeveer 10% van het vocht zodat nu dus iedere kolf 20 ml medium bevat. De aldus verkregen oplossing werd in de koelcel bewaard, maar niet langer dan twee weken. Voor het gebruik werd 0,5 ml geautoclaveerde oplossing d per kolf toegevoegd.

Nauwlettend moet worden toegezien op de kwaliteit van het te gebruiken ferrochloride. Het is namelijk gebleken dat voorraadoplossingen van  $\text{FeCl}_2$  - of ze nu bewaard werden bij  $4^\circ\text{C}$  of bij  $-20^\circ\text{C}$  - al na twee tot drie weken niet meer voor het maken van medium geschikt waren. Werden ze toch gebruikt, dan resulteerde dat in slechte groei en zeer overmatige slijmproductie. De oorzaak van dit verschijnsel moet worden gezocht in het feit, dat  $\text{FeCl}_2$  aan de lucht zeer gemakkelijk geoxydeerd wordt tot  $\text{FeCl}_3$ . Het is niet bekend of de afwijkende groeieigenschappen van Physarum in dit geval te wijten zijn aan de aanwezigheid van  $\text{Fe}^{+++}$ -ionen of aan een gebrek aan  $\text{Fe}^{++}$ -ionen.

#### Het kweken van microplasmodia

Microplasmodia werden gekweekt in kolven en medium als boven beschreven. Ter doorluchting werden de kolven geschud in een New Brunswick Incubator Shaker, type G25. De temperatuur was  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , de schudfrequentie 280 - 300 rpm. Onder deze omstandigheden nam per 72 uur de hoeveelheid microplasmodia tot ongeveer het twintigvoudige toe. Om de cultuur in de logaritmische fase te houden werd

om de dag 1 à 2 ml van een logaritmisch groeiende cultuur overgeënt in een nieuwe kolf met medium.

#### Aanmaak en opslag van microsclerotia

Wanneer een kolf met microplasmodia doorgekweekt werd zonder dat het medium ververst werd, ontstonden na ongeveer twee weken uit de microplasmodia door voedselgebrek microsclerotia. Deze microsclerotia werden afgecentrifugeerd, gewassen in steriel aqua dest. en als dikke suspensie op steriele strookjes filtreerpapier gepipetteerd. Deze strookjes werden in een petrischaal gedurende vier dagen bij een temperatuur van 28°C gedroogd en daarna in de koelcel bewaard. Aldus bereide microplasmodia behielden meer dan twee jaar hun groei-vermogen. Een nieuwe cultuur van microplasmodia kan uit een strookje met microsclerotia aangezet worden door het in een kolf medium te brengen en op de normale manier te schudden. Binnen enkele dagen heeft men dan weer een krachtige cultuur van microplasmodia.

#### Het kweken van macroplasmodia

Macroplasmodia werden gekweekt in petrischalen, die als volgt waren ingericht: in de petrischaal werd een roestvrij stalen grid geplaatst van  $\pm 2,5$  mm hoog en met een maaswijdte van  $\pm 5$  mm. Boven op dit grid werden twee rondjes filtreerpapier gelegd (Schleicher und Schüll, nr. 595) met een diameter van 7 cm. Soms, wanneer pulse-chase-experimenten werden uitgevoerd, werd het bovenste filtreerpapier vervangen door een vierkant ( $36 \text{ cm}^2$ ) stukje lenspapier. De petrischalen werden nu gesteriliseerd door ze gedurende 5 uur te verhitten op 160°C. De macroplasmodia werden altijd bereid uit logaritmisch groeiende microplasmodia en wel als volgt: Microplasmodia werden door langzame centrifugatie verzameld en eenmaal met 15 ml steriel aqua dest. gewassen. Aan de opeengepakte microplasmodia werd 1 volume steriel aqua dest. toegevoegd en het geheel werd geschud tot er een homogene suspensie ontstond. Van deze suspensie werd 1 ml druppelsgewijs op het filtreerpapier gepipetteerd. De petrischalen werden nu 20 à 30 minuten in het donker weggezet om het water in het filtreerpapier te

laten trekken. Na deze tijd werd medium onder het filtreerpapier gegoten tot-  
dat het net vochtig was ( $\pm$  18 ml). Het is zeer belangrijk er voor te zorgen,  
dat geen medium over het plasmodium kan lopen, want dat vertraagt de groei  
enorm.

Vanaf het moment, dat de microplasmodia op het filtreerpapier liggen begint  
de coalescentie tot een groot plasmodium. In tabel 2 is van een serie opeen-  
volgende experimenten de tijdsduur gegeven tussen het moment van pipetteren op  
het filtreerpapier en de tweede synchrone mitose. Het blijkt duidelijk,

Tabel 2. Variatie in tijdsduur tussen coalescentie van microplasmodia en de  
tweede daaropvolgende mitose.

Exp. nr.	Tijd tussen coalescentie en tweede mitose
1	15 hr. 30'
2	14 hr. 15'
3	13 hr.
4	14 hr.
5	13 hr. 45'
6	16 hr. 25'
7	16 hr. 40'
8	19 hr.
9	17 hr. 35'

dat er een grote variatie in deze tijdsduur bestaat. Aangezien het tijdstip,  
waarop experimenten werden uitgevoerd steeds werd uitgedrukt in minuten of uren  
voor of na een mitose, was het dus noodzakelijk bij elke proef het tijdstip,  
waarop een mitose plaats vond te bepalen.

## B. Het plaatsen van de experimenten in de kerncyclus

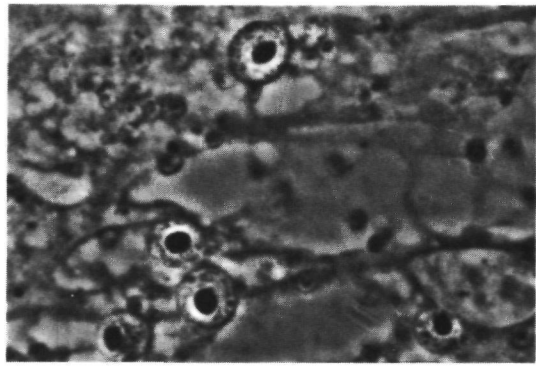
### Bepaling van het tijdstip van mitose

Met een scherppuntige pincet werd een stukje plasmodium van ongeveer  $3 \text{ mm}^2$  van het filtreerpapier geschraapt en overgebracht op een objectglas. Met behulp van een ander objectglas werd dit stukje licht gesquashed en uitgestreken. Onmiddellijk hierna werd enige ogenblikken gefixeerd in alcohol 96%. Na de fixatie werd op het preparaat een druppel alcohol-glycerol (v:v = 1:1) gebracht, waarna met een dekglasje het geheel werd afgedekt. Bij een vergroting van 600x konden de kernen goed onderscheiden worden door middel van fase-contrast-microscopie. In figuur 1 zijn interfase- en mitose-kernen ter demonstratie weer-gegeven. Naast lichtmicroscopie met behulp van fase-contrast werd ook wel licht-microscopie bedreven aan met aceto-orceïne gekleurde preparaten (2 g orceïne in 100 ml azijnzuur 60%). De totale tijdsduur van het kerndelingsproces is ongeveer 20 minuten.

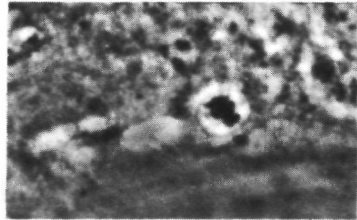
### Plaatsing van het experiment in de cyclus

Meestal werd - door met intervallen van ongeveer 15 minuten microscopische preparaten te maken - de mitose afgewacht. Na het verstrijken van het gewenste aantal minuten of uren na de metafase werd met het experiment begonnen. De plaats van het experiment werd dus betrokken op de voorafgaande mitose. Werd een experiment gestart op 30 minuten na de metafase, dan werd dit tijdstip aangeduid als M + 30'. Was het de bedoeling in de late G2-fase een experiment te doen, dan werd slechts een gedeelte van het plasmodium gebruikt. Met het resterende gedeelte werd het tijdstip van de mitose bepaald, die op het experiment volgde. Op deze manier werd dus achteraf de plaats in de cyclus bepaald ten opzichte van de op het experiment volgende mitose. Werd bijvoorbeeld 90 minuten na het begin van het experiment de metafase gevonden, dan werd het begin van het experiment aangeduid als: MIII - 90'.

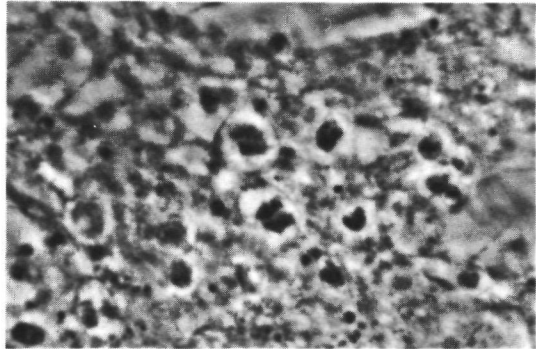
A



B



C



Figuur 1A: Interfase-kern (120 minuten voor de metafase)

Figuur 1B: Kern in metafase

Figuur 1C: Kern in anafase (5 minuten na metafase)

Microscopische preparaten werden vervaardigd zoals in hoofdstuk IIB is beschreven.

Vergroting van de afdruk: 3500 maal.

### C. Het radioactief labelen van de plasmodia

Continu-labeling werd altijd als volgt uitgevoerd: Aan het medium, dat aan coalescerende plasmodia werd toegevoegd bij de bereiding van macroplasmodia, werd  $2\text{-}^{14}\text{C}$ -TdR toegevoegd tot een concentratie van  $0,1\text{ }\mu\text{C/ml}$ . Het plasmodium groeide op dit medium tot aan het begin van de proef. Soms werd ook het eiwit continu gelabeld. De procedure was dan precies hetzelfde met dien verstande, dat radioactieve aminozuren aan het groeimedum werden toegevoegd tot de gewenste sterkte.

Werd pulse-labeling toegepast, dan werd aan het medium waarop het plasmodium groeide  $\text{CH}_3\text{-}^3\text{H}$ -TdR toegevoegd tot de gewenste concentratie, meestal tot  $10\text{ }\mu\text{C/ml}$ . Voor pulse-labeling met hogere  $^3\text{H}$ -activiteiten werd het plasmodium overgebracht in een petrischaal met nieuw, op temperatuur gebracht medium, dat de gewenste hoeveelheid  $\text{CH}_3\text{-}^3\text{H}$ -TdR bevatte.

### D. Het homogeniseren en lyseren van de plasmodia

#### Homogenisatie

Een plasmodium werd opgenomen in 10 ml homogenisatiemedium ( $0,01\text{ M Tris-HCl}$ ,  $0,001\text{ M EDTA}$ ,  $2\%$  Dextraan, pH 7,5,  $0^\circ\text{C}$ ). Werd slechts een gedeelte van een plasmodium gebruikt, dan werd een daarmee evenredige hoeveelheid homogenisatiemedium genomen. De homogenisatie vond plaats door het plasmodium negen keer op te zuigen in en uit te spuiten uit een injectiespuit met lange naald (diameter:  $0,5\text{ mm}$ ). Wanneer het zo verkregen homogenaat niet onmiddellijk verder verwerkt kon worden, werd het bewaard bij  $-20^\circ\text{C}$ .

#### Lyse

Lyse van homogenaten geschiedde door aan de gewenste hoeveelheid homogenaat een gelijk volume lyse-medium toe te voegen ( $0,01\text{ M Tris-HCl}$ ,  $0,001\text{ M EDTA}$ ,  $2\%$  Sarkosyl, pH 7,5,  $0^\circ\text{C}$ ). Het zo verkregen mengsel werd bij  $0^\circ\text{C}$  geïncubeerd en na twee uur was de lyse compleet.

Lyse zonder voorafgaande homogenisatie geschiedde door een plasmodium op te nemen in lyse-medium (minimaal 25 ml per plasmodium) en minstens 16 uur in de



koelcel ( $4^{\circ}\text{C}$ ) te laten staan. Meestal was na 16 uur het plasmodium volledig gelyseerd.

#### E. Fenolextractie

Een half plasmodium werd opgenomen in 1 ml ijskoude 0,2 M Tris-HCl-buffer, pH 7,4, waarin 0,3 M NaCl en 0,02 M EDTA. Na homogenisatie door negen keer op te zuigen in en uit te spuiten uit een injectiespuit met lange naald, werd 1 ml 0,1% SDS, 0,05% NaDOC toegevoegd. Zodra de lyse compleet was werd 5 ml ijskoude alcohol toegevoegd en het mengsel werd tot de volgende dag bewaard bij  $-20^{\circ}\text{C}$ . Het ontstane precipitaat werd met alcohol 70% gewassen en daarna opgelost in 5 ml 0,01 M Tris-HCl-buffer, pH 9,0, waarin 0,15 M NaCl en 2% SDS. Aan deze oplossing werd 5 ml vers gedestilleerde, waterverzadigde fenol toegevoegd en het mengsel werd 10 minuten geschud. Na centrifugatie werden de nucleinezuren uit de waterfase neergeslagen met 2,5 volume alcohol 96% (uit de diepvries,  $-20^{\circ}\text{C}$ ), gewassen met alcohol 70% en opgelost in 3 ml 0,02 M Tris-HCl, pH 8,0.

#### F. Sedimentatie- en dichtheidsanalyse

##### Sedimentatie-analyse

Van de te centrifugeren monsters werd 1 ml gebracht op een lineaire saccharosegradiënt van 12 tot 20% saccharose, die gemaakt was op een onderlaag van 1 ml 70% saccharose. De centrifugatie vond plaats in de Spinco L2/65B bij  $4^{\circ}\text{C}$  en 40.000 rpm met gebruikmaking van de SW40-rotor. Na beëindiging van de centrifugatie werden via een hevel fracties afgetapt.

##### Dichtheidsanalyse

Een bepaalde hoeveelheid van het te analyseren monster werd met 0,01 M Tris-HCl-buffer, pH 8,0 op een gewicht van 4,40 g gebracht. Hierna werd 5,35 g CsCl toegevoegd en na oplossen daarvan werd het zo verkregen preparaat 65 uur gecentrifugeerd in een Spinco L2/65B bij  $4^{\circ}\text{C}$  en 35.000 rpm. Gebruikt werd een rotor van het type 65. Na de centrifugatie werden via een hevel fracties van 10 druppels afgetapt.

#### G. Het meten van de radioactiviteit

Aan een gedeelte van het te meten preparaat of aan het gehele preparaat, wanneer het fracties van saccharose- of CsCl-gradiënten betrof, werd 0,5 ml carrier-DNA toegevoegd (1 mg hitte-gedenatureerd zalm sperma-DNA per ml) of 0,5 ml BSA-oplossing (20 mg BSA per ml). Na goed schudden werd 1 volume 1 N PCA toegevoegd. Na 30 minuten staan in ijs werd het ontstane precipitaat afgecentrifugeerd, twee maal gewassen met 0,5 N PCA en daarna opgenomen in 0,5 ml 0,5 N PCA. Het mengsel werd nu 60 minuten gehydrolyseerd bij 80°C. Na de hydrolyse werd het hydrolysaat kwantitatief overgebracht in telpotjes, en werd 10 ml telvloeistof toegevoegd. De telling werd verricht door een Philips Liquid Scintillation Counter. De samenstelling van de telvloeistof was: 4 g Omnifluor in 1300 ml Triton-tolueen (v:v = 23:77).

In twee gevallen werd een modificatie van deze methode toegepast:

- Werden metingen verricht aan fracties, waarin nog pigment aanwezig was, dan werd na de PCA-precipitatie het neerslag met alcohol gewassen tot het kleurloos was. Daarna werd nog gewassen met PCA om de alcohol te verwijderen.
- Betrof het fracties van een CsCl-gradiënt, dan werd niet met PCA maar met TCA neergeslagen: Met PCA ontstaat er nl. een zeer zwaar precipitaat, vermoedelijk van Cesiumperchloraat, dat storend werkt bij de verdere procedure. Het TCA-neerslag werd twee keer gewassen met alcohol 70% om alle eventueel nog aanwezige CsCl te verwijderen en daarna nog met 0,5 N PCA.

De totale radioactiviteit van een oplossing - dus niet alleen de met zuur precipiteerbare - werd gemeten door 0,5 ml van die oplossing te mengen met 10 ml telvloeistof.

#### H. DNA- en eiwitbepaling

Aan een stukje macroplasmidium, 1 ml microplasmidia of 1 ml lysaat werd 5 ml ijskoude TCA-aceton toegevoegd (5% TCA in 50% aceton). Nadat het mengsel 30 minuten in ijs bewaard was, werd het gecentrifugeerd en het neerslag werd gewassen met ijskoude TCA-aceton totdat het geheel kleurloos was. Hierna werd het neerslag achtereenvolgens nog gewassen met 10 ml 0,5 N PCA en 10 ml alcohol 70%.

Na verdamping van de zich eventueel nog in het neerslag bevindende alcohol werd het neerslag gehydrolyseerd in 0,5 ml 0,5 N PCA (60', 75°C) ter bepaling van het DNA-gehalte met behulp van de diphenylaminetest (Burton, 1956).

Voor de bepaling van het eiwitgehalte volgens Lowry (Lowry et al., 1951) werd het neerslag opgelost in 0,5 N NaOH.

#### I. Bijzondere chemicaliën

De radioactieve stoffen werden betrokken van New England Nuclear Corporation. Van Sigma werden betrokken: DNAse 1, RNAse A (protease-vrij), zalm sperma-DNA, BSA en Haemine. Calbiochem leverde Pronase (B-grade) en Difco was de leverancier van Trypton en gistextract.

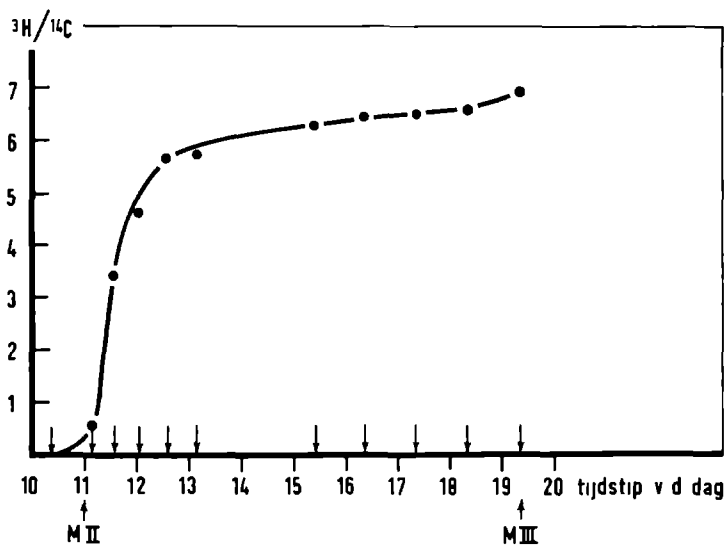
DNA-SYNTHESE GEDURENDE DE KERNCYCLUS VAN PHYSARUM POLYCEPHALUMA. Inleiding

Zoals in hoofdstuk I reeds is uiteengezet kan de kerncyclus van Physarum polycephalum naast de mitose in twee fasen worden ingedeeld. De S-fase, waarin het merendeel van het totale DNA wordt gerepliceerd, en de G2-fase, waarin slechts weinig DNA-synthese plaats vindt. Gedurende de S-fase, die zonder voorafgaande G1-fase onmiddellijk volgt op de mitose, vindt de replicatie van vrijwel het gehele chromosomale DNA plaats, terwijl in de G2-fase vrijwel uitsluitend mitochondriaal en nucleolair DNA gesynthetiseerd worden (Guttes et al., 1967; Braun en Evans, 1969; Holt en Gurney, 1969). Een gering aantal kernen gaat voortdurend door met de aanmaak van chromosomaal DNA (Guttes en Guttes, 1969).

Daar speciaal voor het onderhavige onderzoek de cultuur van Physarum polycephalum op ons laboratorium ter hand is genomen, is het noodzakelijk na te gaan of de bovenstaande gegevens ook op onze cultuur van toepassing zijn. Met behulp van dichtheidsanalyse werd onderzocht of ook in onze cultuur de chromosomale DNA-synthese voornamelijk beperkt is tot de S-fase, terwijl in de G2-fase vrijwel alleen synthese van mitochondriaal en nucleolair DNA plaats vindt. Bovendien zijn in dit hoofdstuk de sedimentatie-eigenschappen in saccharose-gradiënten bestudeerd van de in verschillende perioden van de kerncyclus gesynthetiseerde DNA's.

B. ResultatenVerdeling in S- en G2-fase

Het voorkomen van een S- en G2-fase in de door ons gekweekte macroplasmodia is gedemonstreerd in figuur 2. De cyclusduur in dit experiment bedraagt ongeveer  $8\frac{1}{2}$  uur, de S-fase neemt ongeveer 2 uur in beslag. Gedurende de G2-fase is een geringe maar duidelijke toename van de met zuur precipiteerbare radioactiviteit



Figuur 2: TdR-incorporatie gedurende de kerncyclus van Physarum polycephalum. Een continu met  $^{14}\text{C}$ -TdR gelabeld plasmodium werd 40 minuten voor M II overgebracht op medium dat  $5\text{ }\mu\text{C}$   $^3\text{H}$ -TdR per ml bevatte. Op de aangegeven tijdstippen werd een stuk van het plasmodium van het filtreerpapier afgeschraapt en zonder voorafgaande homogenisatie gelyseerd in 3 ml lyse-medium. De ret zuur precipiteerbare radioactiviteit in het lysaat werd gemeten zoals beschreven is in hoofdstuk II.

waar te nemen. Dit wijst er op dat er nog DNA-aanmaak plaats vindt. De duur van de S-fase ligt in dezelfde orde van grootte als door de meeste auteurs gevonden wordt, zoals blijkt uit tabel 3. Uit tabel 3 kan men ook aflezen, dat er blijk-

Tabel 3. Literatuurgegevens over de duur van de kerncyclus en de S-fase in macroplasmodia van Physarum polycephalum.

Cyclusduur in uren	Duur S-fase in uren	Referentie
11	$1\frac{1}{2}$	Solao en Shall, 1971
10	3	Sachsenmaier, 1968
-	$2\frac{1}{2}$	Braun, Mittermayer en Rusch, 1965
-	3	Braun en Wili, 1969
-	$2\frac{1}{2}$	Braun et al., 1966
9	$3\frac{1}{2}$	Sachsenmaier, 1964
12 - 20	1 - 2	Nygaard et al., 1960
9 - 12	4	Rao en Gontcharoff, 1969
8	$1\frac{1}{2}$ - 2	Muldoon et al., 1971
-	4	Cummins et al., 1966

baar geen verband bestaat tussen de cyclusduur en de lengte van de S-fase. Om deze reden is telkens wanneer het de bedoeling was een experiment in de S-fase uit te voeren, dat experiment uitgevoerd tussen 0 en 90 minuten na een metafase. Was het de bedoeling een experiment in de G2-fase uit te voeren, dan werd gewacht tot minstens vier uur na de mitose. De S-fase was dan zeker afgelopen.

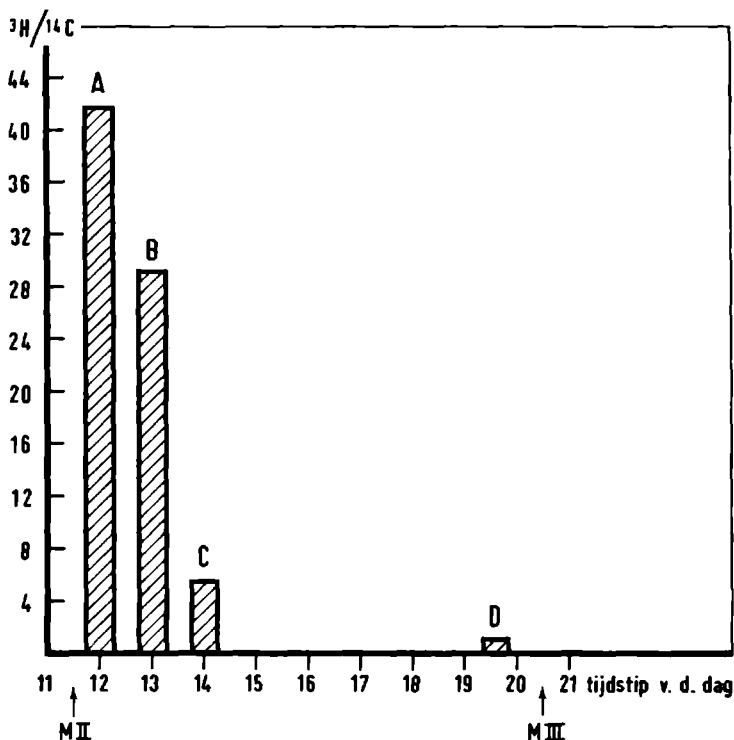
#### Dichtheidsanalyse van in S- en G2-fase gesynthetiseerd DNA

Om te zien of in de verschillende fasen van de kerncyclus ook verschillende DNA's gesynthetiseerd worden, is het volgende experiment uitgevoerd: Op het tijdstip van mitose II werd een met  $^{14}\text{C}$ -TdR continu gelabeld plasmodium in vier

gelijke stukken verdeeld. Op verschillende tijdstippen - zoals in figuur 3 is aangegeven - werd telkens een stuk van het plasmodium gedurende 30 minuten gekweekt in aanwezigheid van  $^3\text{H}$ -TdR. Onmiddellijk na de pulse werd het betreffende stuk overgebracht in lysemedium en bij  $0^\circ\text{C}$  bewaard tot alle vier de stukken pulse-gelabeld waren. Nadat de lyse voltooid was werd de met zuur precipiteerbare radioactiviteit van het lysaat gemeten. In figuur 3 is de verhouding  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  in de lysaten weergegeven. Ook hier manifesteert zich weer duidelijk de verdeling van de interfase in een S- en G2-fase. Gedurende de eerste twee à drie uur na de mitose is er een zeer sterke inbouw van TdR, terwijl in het overige deel van de cyclus slechts weinig incorporatie plaats vindt.

Dichtheidsanalyse met behulp van CsCl-gradiënten van het DNA in de besproken lysaten levert het resultaat, getoond in figuur 4. De verdeling van het totale DNA - zoals weergegeven is door de verdeling van de  $^{14}\text{C}$ -activiteit - komt in alle gradiënten praktisch geheel en al overeen met wat uit de literatuur bekend is (Braun en Evans, 1969; Holt en Gurney, 1969). Het grootste gedeelte van het DNA(I), het chromosomale DNA, komt bijeen in een grote piek. Het mitochondriale DNA(II), dat een geringere zweefdichtheid heeft als het chromosomale DNA, is te herkennen als een duidelijke schouder aan de lichte kant van de hoofdpijk. Het nucleolaire DNA(III), dat maar een zeer klein gedeelte van het totale DNA uitmaakt, is niet of nauwelijks als een schoudertje aan de zware kant van de hoofdpijk te herkennen. In tegenstelling tot wat in de literatuur gevonden is, wordt in ons geval steeds een kleine, doch niet te verwaarlozen fractie van het totale DNA helemaal boven in de gradiënt gevonden. Weliswaar vinden Holt en Gurney (1969) na pulse-labeling met  $^3\text{H}$ -TdR een zeer geringe  $^3\text{H}$ -activiteit boven in hun CsCl-gradiënt - in omvang variërend van 2 tot 10% van de totale hoeveelheid geïncorporeerde label - maar het bleek na hydrolyse en chromatografie van de hydrolyse-producten, dat deze activiteit niet gebonden was aan thymine. In dit experiment is dit echter niet het geval zoals zal worden aangetoond in hoofdstuk VII.

Aan de verdeling van de  $^3\text{H}$ -activiteit in de gradiënten is te zien, dat gedurende de S-fase (figuur 4A,B) vrijwel uitsluitend chromosomaal DNA gesynthe-



Figuur 3: TdR-incorporatie gedurende de kerncyclus van Physarum polycephalum. Een continu met  $^{14}\text{C}$ -TdR gelabeld plasmodium werd op het tijdstip van mitose II in vier gelijke delen verdeeld. Gedurende de perioden A, B, C en D werd een stuk gekweekt op medium, dat 100  $\mu\text{C}$   $^3\text{H}$ -TdR per ml bevatte. Na de pulse werden de stukken zonder voorafgaande homogenisatie gelyseerd in 5 ml lyse-medium. De met zuur precipiteerbare radioactiviteit in de lysaten werd gemeten zoals beschreven is in hoofdstuk II.

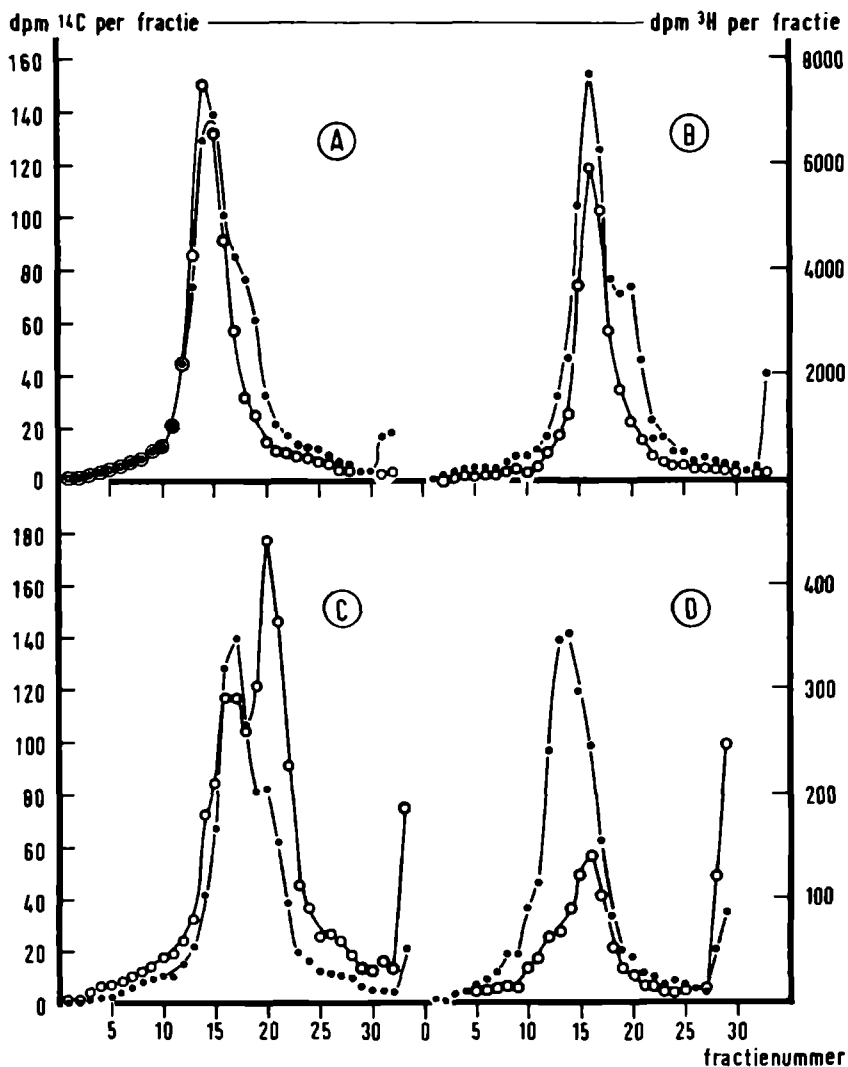
A Pulse-label van M II + 15' tot M II + 45'

B Pulse-label van M II + 75' tot M II + 105'

C Pulse-label van M II + 135' tot M II + 165'

D Pulse-label van M III - 70' tot M III - 40'





Figuur 4: Dichtheidsanalyse van DNA, dat gedurende verschillende perioden van de kerncyclus van Physarum polycephalum gesynthetiseerd wordt.

Met 0,2 ml van de in figuur 3 beschreven lysaten werd een dichtheidsanalyse uitgevoerd zoals beschreven is in hoofdstuk II. De met zuur precipiteerbare radioactiviteit is gemeten zoals beschreven is in hoofdstuk II. De radioactiviteit van de fracties is omgerekend tot een totaal van 1000 dpm  $^{14}\text{C}$  per gradiënt.

Fractie 1 is de bodem van de gradiënt.

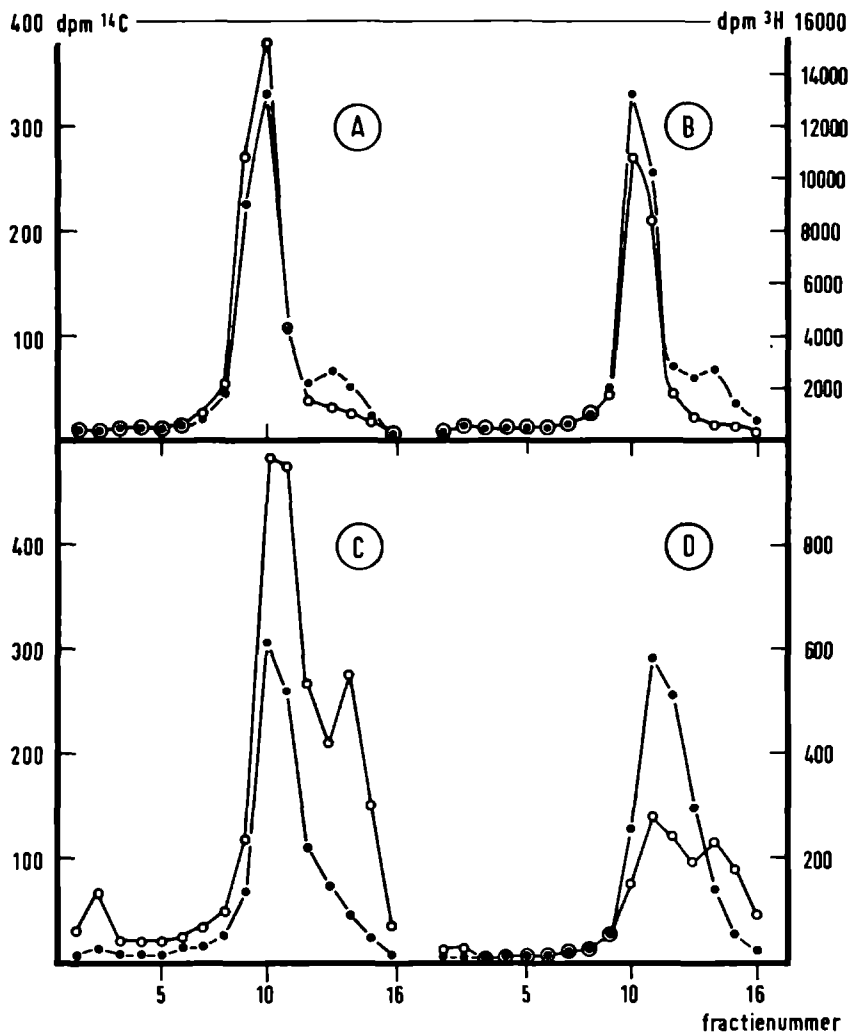
● —● dpm  $^{14}\text{C}$       ○ —○ dpm  $^3\text{H}$

tiseerd wordt. Incorporatie van  $^3\text{H}$  in het mitochondriaal en nucleolair DNA kan niet met zekerheid vastgesteld worden, terwijl er - zo lijkt het - ook geen inbouw heeft plaats gevonden in het DNA dat zich ophoopt boven in de gradiënt. Opvallend is nog, dat het DNA dat gedurende de eerste periode van 30 minuten gesynthetiseerd wordt een ietwat grotere zweefdichtheid heeft dan wat in een latere periode van de S-fase gesynthetiseerd wordt. Dit verschijnsel, dat DNA dat in het begin van de S-fase gesynthetiseerd wordt soortelijk dichter is dan wat later in de S-fase gesynthetiseerd wordt, is ook door Braun en Ruedi-Wili (1971) waargenomen.

Kennelijk heeft de derde labelperiode (figuur 4C) net op de grens van S-fase en G2-fase plaats gevonden. Er heeft duidelijk nog synthese van een - zij het zeer geringe - hoeveelheid chromosomaal DNA plaats gevonden. Een deel van deze  $^3\text{H}$ -incorporatie echter is wellicht te danken aan de door Guttes en Guttes (1969) geconstateerde synthese van chromosomaal DNA in de G2-fase. Daarnaast is evenwel duidelijk te zien dat gedurende deze periode een aanzienlijke synthese van mitochondriaal DNA heeft plaats gevonden en bovendien nog - hoewel in mindere mate - synthese van nucleolair DNA. Opmerkelijk ook in deze gradiënt is het feit dat er een duidelijke incorporatie van  $^3\text{H}$  heeft plaatsgevonden in het DNA dat zich boven in de gradiënt heeft opgehoopt. Gedurende de vierde labelperiode (figuur 4D), die vlak voor de volgende mitose heeft plaats gevonden, is klaarblijkelijk geen of zeer weinig chromosomaal DNA gesynthetiseerd. Synthese van mitochondriaal en waarschijnlijk ook nucleolair DNA heeft wel plaats gevonden, hoewel in mindere mate als in de derde labelperiode. De inbouw in het DNA met de zeer geringe dichtheid is van dezelfde orde van grootte als die in de derde labelperiode.

#### Sedimentatie-analyse van in S- en G2-fase gesynthetiseerd DNA

Het resultaat van de sedimentatie-analyse van de DNA's in de verschillende lysaten is weergegeven in figuur 5. Uit de verdeling van de  $^{14}\text{C}$ -activiteit over de gradiënten blijkt, dat op grond van zijn sedimentatie-eigenschappen het DNA van Physarum in twee fracties uiteen valt. Het grootste gedeelte van het DNA



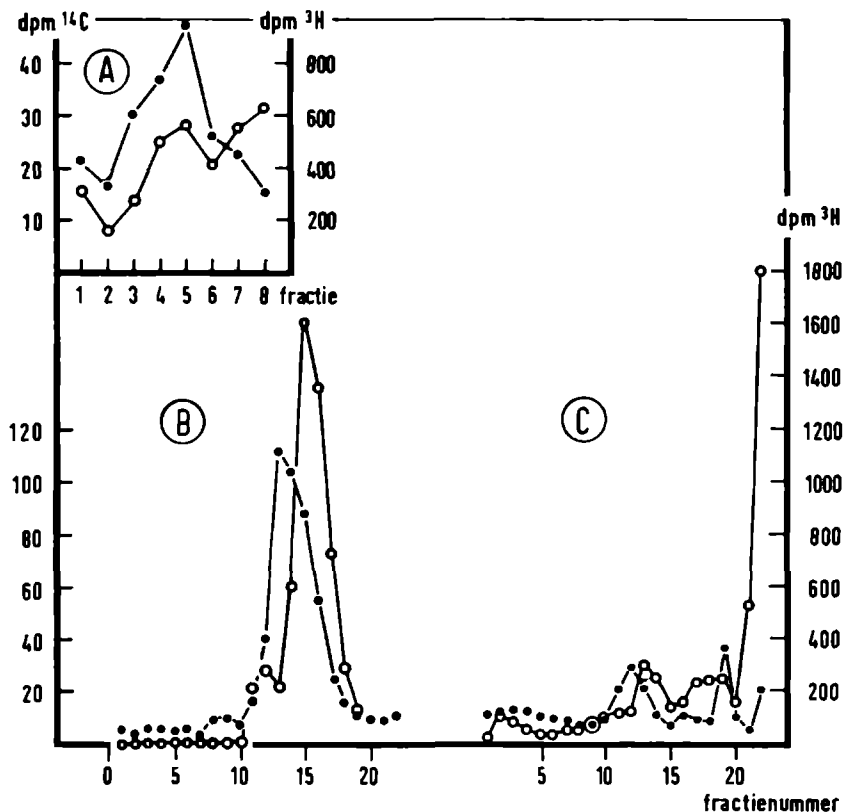
Figuur 5: Sedimentatie-analyse van DNA, dat gedurende verschillende perioden van de kerncyclus gesynthetiseerd wordt.

Van de in figuur 3 beschreven lysaten werd 0,2 ml met 0,01 M Tris-HCl buffer, pH 7,5 aangevuld tot 1 ml en 7 uur gecentrifugeerd over een lineaire saccharosegradiënt zoals beschreven is in hoofdstuk II. De radioactiviteit van de fracties is omgerekend tot een totaal van 1000 dpm  $^{14}\text{C}$  per gradiënt. Fractie 1 is de bodem van de gradiënt.

●—● dpm  $^{14}\text{C}$     ○—○ dpm  $^3\text{H}$

sedimenteert onder de gegeven omstandigheden als een homogene plek bijna naar het midden van de gradiënt, terwijl een klein gedeelte van het DNA een veel geringere sedimentatiesnelheid heeft en praktisch boven in de gradiënt blijft zitten. In de gradiënten van de twee laatste labelperioden (figuur 5C,D) is de scheiding niet zo duidelijk als in die van de twee eerste labelperioden (figuur 5A,B). Uit de  $^3\text{H}$ -verdeling over de gradiënten blijkt, dat DNA dat in de S-fase (figuur 5A,B) gesynthetiseerd wordt cosedimenteert met het hoofdfractie-DNA. Gedurende de G2-fase (figuur 5C,D) wordt niet alleen DNA gesynthetiseerd, dat cosedimenteert met het hoofdfractie-DNA, maar ook vindt er een duidelijke incorporatie van  $^3\text{H}$ -TdR plaats in de langzaam sedimenterende fractie.

In het volgende experiment is nagegaan welke zweefdichtheid de twee soorten DNA hebben, die op grond van hun sedimentatiesnelheid onderscheiden kunnen worden: Een met  $^{14}\text{C}$ -TdR continu gelabeld plasmodium werd in de G2-fase gedurende  $3\frac{1}{2}$  uur gekweekt in de aanwezigheid van  $^3\text{H}$ -TdR. Na deze periode werd het plasmodium gelyseerd en van het lysaat werden drie saccharose-gradiënten gedraaid. Na de run werden de gradiënten gefractioneerd en de overeenkomstige fracties werden samengevoegd. Van een gedeelte van de gecombineerde fracties werd de net zuur precipiteerbare radioactiviteit gemeten. Het sedimentatiepatroon is weergegeven in figuur 6A. Ook nu weer blijkt dat er incorporatie is opgetreden in de twee reeds eerder genoemde fracties. Van fractie 5 en fractie 8 uit figuur 6A werd nu met behulp van  $\text{CsCl}$ -gradiëntcentrifugatie een dichtheidsanalyse gemaakt. Het resultaat van deze analyse is weergegeven in figuur 6B,C. Het blijkt dat het met  $^3\text{H}$ -gelabeld materiaal, dat cosedimenteert met het hoofdfractie-DNA, waarschijnlijk alleen maar bestaat uit mitochondriaal en nucleolair DNA (figuur 5B). Uit figuur 5C blijkt dat - afgezien van zeer kleine hoeveelheden mitochondriaal en nucleolair DNA, die te wijten zijn aan de niet volledige scheiding van het snel sedimenterende en langzaam sedimenterende DNA - de langzaam sedimenterende fractie bestaat uit DNA met een zeer geringe dichtheid.



Figuur 6: Dichtheidsanalyse van in de G2-fase gesynthetiseerd DNA na voorafgaande scheiding door middel van saccharose-gradiënten.

Een continu met  $^{14}\text{C}$ -TdR gelabeld plasmodium werd van M III - 4 uur tot M III -  $\frac{1}{2}$  uur gekweekt op medium dat  $5 \mu\text{C}$   $^3\text{H}$ -TdR per ml bevatte. Na deze periode werd het plasmodium opgenomen in 20 ml lyse-medium en zonder voorafgaande homogenisatie gelyseerd. Van het zo verkregen lysaat werd drie maal 1 ml gecentrifugeerd over een lineaire saccharose-gradiënt zoals beschreven is in hoofdstuk II. Na fractionering van elke gradiënt in 8 fracties werden de overeenkomstige fracties gecombineerd. De radioactiviteit in deze fracties is gemeten zoals beschreven is in hoofdstuk II. Het op deze manier verkregen gemiddelde sedimentatiepatroon is in figuur 5A weergegeven.

Met het overblijvende deel van fractie 5 (figuur 5B) en van fractie 8 (figuur 5C) werd een dichtheidsanalyse uitgevoerd zoals beschreven is in hoofdstuk II.

●—● dpm  $^{14}\text{C}$     ○—○ dpm  $^3\text{H}$

## C. Discussie

Uit de in dit hoofdstuk gepresenteerde experimenten (figuur 2, 3) blijkt duidelijk dat ook onder de bij dit onderzoek gebruikte omstandigheden de kerncyclus van Physarum polycephalum te verdelen is in twee fasen: de S-fase, waarin het merendeel van het DNA gerepliceerd wordt, en een G2-fase. Tevens kan geconstateerd worden, dat er bij Physarum geen G1-fase optreedt. De tijdsduur van de S-fase is niet constant: in het ene experiment (figuur 2) duurt de S-fase ongeveer 2 uur, in het andere (figuur 3) ongeveer  $2\frac{1}{2}$  uur. Ook uit de literatuurgegevens, zoals gepresenteerd in tabel 3, blijkt dat de tijdsduur van de S-fase niet constant is. Over de factoren die mogelijk aan deze fluctuaties ten grondslag liggen, is niets bekend.

Op grond van het sedimentatiegedrag kan het DNA van Physarum verdeeld worden in twee fracties: een snel sedimenterende en een met een lage sedimentatiesnelheid. Incorporatie van  $^3\text{H}$ -TdR in de snel sedimenterende fractie vindt gedurende de hele cyclus plaats, terwijl daarentegen inbouw in de langzaam sedimenterende fractie alleen tijdens de G2-fase lijkt plaats te vinden.

Op grond van de zweefdichtheid kan het DNA verdeeld worden in 4 fracties: het nucleolaire, het chromosomale, het mitochondriale DNA en een fractie met zeer geringe zweefdichtheid. Gedurende de S-fase vindt incorporatie van  $^3\text{H}$ -TdR vrijwel uitsluitend plaats in het chromosomaal DNA, terwijl in de G2-fase - naast een geringe inbouw in DNA met dezelfde dichtheid als chromosomaal DNA - voornamelijk inbouw in het nucleolaire en mitochondriale DNA plaats vindt. In de fractie met zeer geringe dichtheid vindt duidelijke inbouw plaats gedurende de G2-fase; of er ook synthese van dit materiaal gedurende de S-fase is, kan niet met zekerheid vastgesteld worden.

Uit de in dit hoofdstuk gepresenteerde experimenten valt niet op te maken of gedurende de S-fase synthese van nucleolair en mitochondriaal DNA al of niet plaats vindt. Door Braun en Evans (1969) evenwel is met behulp van selectieve extractie aangetoond, dat tijdens de S-fase aanmaak van satelliet-DNA plaats vindt.

De door ons gevonden langzaam sedimenterende DNA-fractie en de fractie met

zeer geringe dichtheid blijken hetzelfde materiaal te vertegenwoordigen. Vanwege de zeer geringe sedimentatiesnelheid van deze fractie wordt ze door ons LS-DNA genoemd. In de hoofdstukken VI en VII van dit proefschrift zal beschreven worden hoe langs biologische respectievelijk biochemische weg gepoogd is nadere gegevens te verkrijgen over de aard van het LS-DNA.

SEDIMENTATIEGEDRAG VAN DNA, PULSE-GELABELD TIJDENS DE S-FASEA. Inleiding

In dit hoofdstuk wordt een poging beschreven om meer inzicht te krijgen in hoe de DNA-replicatie bij eucaryoten in zijn werk gaat. Daartoe werd het sedimentatiegedrag in saccharose-gradiënten van replicerend DNA onderzocht. De aanleiding om het sedimentatiegedrag te onderzoeken is onze veronderstelling dat de DNA-replicatie plaats vindt in of aan een complex, dat bestaat uit het replicerend DNA en andere cellulaire stoffen of structuren. Door de cel zo mild mogelijk te lyseren tijdens de S-fase en het lysaat aan een sedimentatie-analyse te onderwerpen, zou het mogelijk moeten zijn het replicatiecomplex, waarvan tevens verondersteld wordt, dat het een grotere sedimentatiesnelheid heeft dan niet-replicerend DNA, te scheiden van het niet-replicerend DNA.

De literatuurgegevens, die ons aanleiding hebben gegeven een dergelijk complex te veronderstellen zijn de volgende.

- 1) Werden in vitro gekweekte, asynchroon groeiende zoogdiercellen gedurende korte tijd gekweekt in aanwezigheid van  $^3\text{H}$ -TdR, dan bleek na fenol- of chloroform-isoamylalcohol-extractie het DNA met de hoogste specifieke activiteit zich te bevinden in de interfase (Ben Porat et al., 1962; Friedman en Mueller, 1969; Paoletti et al., 1967; Levis et al., 1967). Dit verschijnsel werd evenwel door sommige auteurs niet waargenomen (Habener et al., 1969; Berger en Irvin, 1970). Het zich in de interfase bevindende, sterk pulse-gelabelde materiaal kon als replicerend DNA worden aangemerkt door aan te tonen, dat na een chase-periode in niet-radioactief medium de specifieke radioactiviteit van het interfase-DNA gelijk bleek te worden aan die van het totale DNA (Ben Porat et al., 1962; Levis et al., 1967; Friedman en Mueller, 1969). Dit verschijnsel trad niet op wanneer de DNA-synthese gedurende de chase werd stopgezet met behulp van hydroxyureum (Friedman en Mueller, 1969). Na oplossen van de interfase in SDS-buffer en centrifugeren van die oplossing over een



lineaire saccharose-gradiënt vonden Friedman en Mueller dat het interfase-DNA bestond uit twee fracties: een zeer snel sedimenterende met een hoge specifieke activiteit en een langzaam sedimenterende met een lage specifieke activiteit. Het sedimentatiegedrag van het interfase-DNA veranderde niet door behandeling met pronase.

Ook het pulse-gelabeld DNA dat na de fenol- of chloroform-isoamylalcohol-extractie in de waterfase terecht komt vertoont eigenschappen die van het niet-replicerend DNA afwijken. Bij MAK-kolomchromatografie bleek dat een deel van het pulse-gelabelde materiaal dezelfde affiniteit tot de kolom had als gewoon DNA, maar dat ook veel DNA met hoge specifieke activiteit zeer sterk gebonden werd aan de kolom en slechts met hoge NaCl-concentraties ge-elueerd kon worden (Paoletti et al., 1967; Holoubek, 1967; Probst, 1970, 1971; Harrison, 1971).

Deze resultaten doen vermoeden, dat het replicerend DNA aan een of andere structuur gebonden is. Het feit, dat het sedimentatiegedrag van het interfase-DNA niet verandert na pronase-behandeling, wijst er op dat deze structuur mogelijk een lipide-achtig karakter heeft.

- 2) Door Pearson en Hanawalt (1971) werden van pulse-gelabelde HeLa-cellen de kernen geïsoleerd en achtereenvolgens met pronase en NaCl behandeld. Het aldus verkregen lysaat werd gesheared en op 0,5% SDS gebracht. Sedimentatie van dit lysaat bij 2°C in een saccharose-gradiënt leerde, dat een groot deel van het pulse-gelabeld DNA met de onder invloed van de lagere temperatuur ontstane SDS-kristallen cosedimenteerde en aldus van het niet-replicerend DNA te scheiden was. Door Hanaoka en Yamada (1971) werd gevonden, dat het replicerend DNA van HeLa-cellen gebonden werd aan magnesiumsarkosylaat-kristallen na toepassing van de M-band-techniek van Tremblay en medewerkers (1969). De door het gedrag bij fenol- en chloroform-isoamylalcohol-extractie al gewekte suggestie, dat het replicerend DNA aan een lipide-achtige structuur gebonden zou kunnen zijn, wordt door deze waarnemingen nog versterkt.
- 3) Electronenmicroscopisch-autoradiografisch onderzoek van Comings en Kakefuda (1968) en O'Brien en medewerkers (1972) had als resultaat, dat het replicerend

DNA van zoogdiercellen met de kernmembraan geassocieerd zou zijn. Ook langs biochemische weg is aangetoond, dat replicerend DNA aan de kernmembraan gebonden is (O'Brien et al., 1972; Mizuno et al., 1971A, 1971B).

Over de vraag of het replicerend DNA inderdaad aan de kernmembraan gebonden is heerst grote onzekerheid daar het andere auteurs steeds niet gelukt is de associatie van replicerend DNA met de kernmembraan aan te tonen (Williams en Ockey, 1970; Erlandson en de Harven, 1971; Ockey, 1972; Fakan et al., 1972; Huberman et al., 1973; Kay et al., 1971). Comings zelf was in een later artikel niet in staat zijn vroegere waarneming te bevestigen (Comings en Okada, 1973).

Door Fakan en medewerkers (1972) wordt er op gewezen, dat de hierboven beschreven eigenschappen van replicerend DNA mogelijk te wijten zijn aan niet-specifieke, artificiële complexvorming van het replicerend DNA en andere celcomponenten tijdens de lyse- en fractioneringsprocedures. De oorzaak van deze complexvorming zou gelegen kunnen zijn in het feit dat replicerend DNA - althans voor een gedeelte - enkelstrengig is zoals ook door Sato en medewerkers (1970) en Schandl en Taylor (1969) is aangetoond. Fakan en medewerkers (1972) toonden immers aan dat gedenatureerd DNA in grote lijnen dezelfde eigenschappen heeft als replicerend DNA.

De boven beschreven aanwijzingen voor het bestaan van een replicatiecomplex zijn uitsluitend gevonden bij zoogdiermateriaal; bovendien zijn die aanwijzingen niet door iedere auteur, die zich met de betreffende problematiek heeft bezig gehouden, gevonden. Toch meenden wij van de veronderstelling uit te kunnen gaan dat de DNA-replicatie in Physarum polycephalum via een dergelijk complex zou verlopen. Door bestudering van het sedimentatiegedrag van in de S-fase pulselabeld DNA meenden wij dit complex te kunnen aantonen en eventueel te karakteriseren.

## B. Resultaten

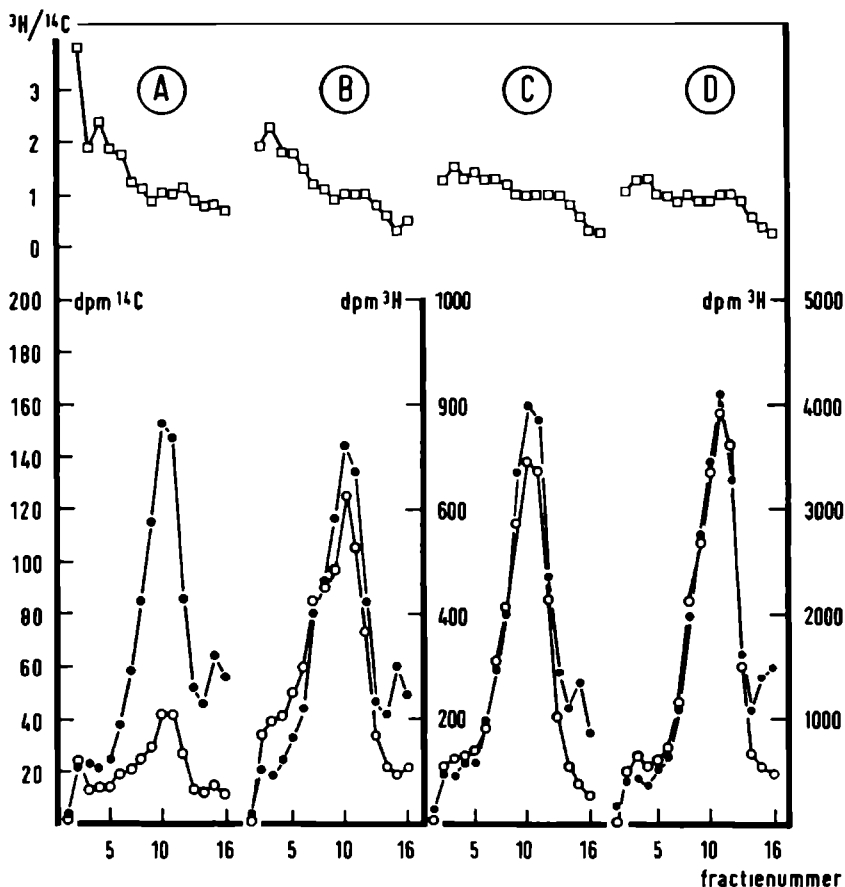
Een met  $^{14}\text{C}$ -TdR continu gelabeld plasmodium werd, vanaf 15 minuten na de tweede mitose volgend op de coalescentie van de microplasmodia, overgebracht op

medium waarin  $100 \mu\text{C } ^3\text{H-TdR}$  per ml aanwezig was. Na 4(A), 8(B), 16(C) en 30(D) minuten werd  $\frac{1}{4}$  deel van het plasmodium van het filtreerpapier geschraapt en gehomogeniseerd en gelyseerd als in hoofdstuk II beschreven. Het sedimentatiepatroon in lineaire saccharose-gradiënten is weergegeven in figuur 7.

Het sedimentatiepatroon van het totale DNA - zoals te zien is aan de verdeling van de  $^{14}\text{C}$ -activiteit over de gradiënt - is vrijwel hetzelfde als weergegeven is in figuur 5. Het grootste gedeelte van het totale DNA sedimenteert onder de gegeven omstandigheden naar het midden van de gradiënt, terwijl een klein gedeelte praktisch boven in de gradiënt blijft zitten en een ander gedeelte zich onder in de gradiënt, op de onderlaag van 70% saccharose, ophoopt. Het is niet zeker, dat het zich onder in de gradiënt bevindende materiaal alleen bestaat uit DNA dat inderdaad een grotere sedimentatiesnelheid heeft als de rest van het DNA: mogelijk is het - althans voor een deel - daar terecht gekomen doordat het langs de wand van de centrifugebuis is doorgeschoten (Moore, 1969).

De verdeling van het gedurende de labelperiode gesynthetiseerde DNA valt niet volledig samen met die van het totale DNA. Vooral aan de ratio  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  is te zien dat in de gradiënten A en B een relatief groot gedeelte van  $^3\text{H}$ -gelabeld materiaal sneller sedimenteert dan het grootste gedeelte van het  $^{14}\text{C}$ -gelabelde materiaal. Om het verschil des te duidelijker aan te geven is van elke fractie de ratio  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  betrokken op de ratio van de topfractie van de hoofdpijk van het continu gelabeld DNA. Op deze manier is dus gegeven hoeveel maal groter of kleiner de ratio  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  van een bepaalde fractie is dan die van de topfractie van het  $^{14}\text{C}$ -gelabeld materiaal. Het is duidelijk dat er in het zeer langzaam sedimenterend gedeelte van het continu gelabeld materiaal zeer weinig incorporatie van  $^3\text{H-TdR}$  heeft plaats gevonden.

Het sedimentatiepatroon van het gedurende de labelperiode gesynthetiseerde DNA komt overeen met wat op grond van de in de inleiding van dit hoofdstuk uitgesproken veronderstelling werd verwacht. Blijkbaar heeft een gedeelte van het gerepliceerde DNA een hogere sedimentatiesnelheid dan het totale DNA. Aangezien,



Figuur 7: Sedimentatiegedrag van DNA, pulse-gelabeld tijdens de S-fase. Een met  $^{14}\text{C}$ -TdR continu gelabeld plasmodium werd vanaf M II + 15' gekweekt op medium waarin 100  $\mu\text{C}$   $^3\text{H}$ -TdR per ml aanwezig was. Na 4(A), 8(B), 16(C) en 30(D) minuten werd  $\frac{1}{4}$  deel van het plasmodium van het filtreerpapier afgeschraapt, gehomogeniseerd, gelyseerd en gedurende  $4\frac{1}{2}$  uur gecentrifugeerd zoals beschreven is in hoofdstuk II. De met zuur precipiteerbare radioactiviteit van de fracties werd gemeten zoals beschreven is in hoofdstuk II. Fractie 1 is de bodem van de gradient.

●—● dpm  $^{14}\text{C}$     ○—○ dpm  $^3\text{H}$     □—□  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$

naarmate de labelperiode langer wordt, de relatieve ratio in het snel sedimenterende gedeelte afneemt en na 30 minuten nagenoeg de waarde van die van de topfracties van het continu-gelabelde materiaal bereikt, ligt het voor de hand aan te nemen dat we hier te doen hebben met replicerend DNA.

Een reële scheiding tussen het replicerend en niet-replicerend DNA is echter niet opgetreden. Zelfs na de korte pulse-labeling van 4 minuten is het in die tijd gerepliceerde DNA verspreid over de gehele gradiënt. Daar voor een nader onderzoek een betere scheiding van het eventuele complex en het niet-replicerend DNA noodzakelijk is, is geprobeerd dit te bereiken door variaties aan te brengen in de procedure.

Toevoeging van saccharose tot een concentratie van 20% aan de homogenisatiebuffer in plaats van dextraan leverde geen betere scheiding op. Saccharose had echter als nadeel dat in zijn aanwezigheid niet altijd complete lyse van het plasmodium optrad zodat een deel van de totale met zuur precipiteerbare radioactiviteit naar de bodem van de buis centrifugeerde. Werd saccharose of dextraan helemaal uit de homogenisatiebuffer weggelaten, dan trad er bijna nooit een scheiding op tussen meer of minder sterk pulse-gelabeld materiaal.

Vervanging van Sarkosyl door andere detergentia zoals SDS, Tween 80 en Triton X-100 had geen betere scheiding tot resultaat. In aanwezigheid van de niet-ionische detergentia trad zelfs vrijwel geen lyse van de kernen op.

Van groot belang voor de scheiding is de concentratie van het lysaat. Het is gebleken, dat naarmate minder plasmodiummateriaal op de gradiënt wordt gebracht de scheiding tussen relatief sterk en minder sterk pulse-gelabeld materiaal beter is. Een al te sterke verdunning kan echter niet worden toegepast omdat dan de hoeveelheid radioactiviteit per fractie te gering wordt om nog nauwkeurig gemeten te kunnen worden. De in figuur 7 toegepaste verdunning - een plasmodium per 20 ml lysaat - bleek het beste te voldoen.

Verandering van de helling van de lineaire saccharose-gradiënten als ook het toepassen van convexe en concave gradiënten leverde geen duidelijker scheiding op.

Samenvattend kan dus gezegd worden dat alle pogingen om de scheiding tussen

meer en minder sterk pulse-gelabeld DNA te verbeteren geen positief resultaat hebben opgeleverd. Deze slechte scheiding maakt het ook onmogelijk pulse-chase-experimenten te interpreteren; het is namelijk volstrekt onmogelijk met zekerheid vast te stellen wat er met het snel sedimenterende sterk pulse-gelabelde materiaal tijdens de chase-periode gebeurt.

### C. Discussie

De bedoeling van het in dit hoofdstuk gepresenteerde werk was na te gaan, of het mogelijk zou zijn het in de inleiding van dit hoofdstuk gepostuleerde replicatiecomplex aan te tonen. Inderdaad is uit het gepresenteerde experiment gebleken dat, na lyse van het plasmodium in de S-fase na pulse-labeling met  $^3\text{H}$ -TdR, een gedeelte van het DNA, dat sneller sedimenteert dan de rest, een hogere specifieke  $^3\text{H}$ -activiteit heeft dan het overige DNA. Tevens bleek dat het verschil in relatieve specifieke activiteit tussen het snel sedimenterende DNA en het overige DNA minder werd na voortgezette labeling. Dit resultaat is in volledige overeenstemming met wat verwacht werd.

De door Fakan en medewerkers (1972) naar voren gebrachte mogelijkheid dat replicerend DNA artificieel in complexen zou kunnen worden opgenomen, wordt door het gepresenteerde experiment niet ontzenuwd. Het zou zeer wel mogelijk kunnen zijn, dat in het pas gerepliceerde DNA nog enkelstreng-stukjes voorkomen en het daardoor - althans voor een gedeelte - specifiek aan snel sedimenterende structuren gebonden wordt.

Het door ons verkregen resultaat is in overeenstemming met wat Brewer (1972) gevonden heeft. Hij vergeleek het sedimentatiegedrag van een kernlysaat van een in de S-fase pulse-gelabeld plasmodium met dat van een kernlysaat van een tot in de G2-fase continu gelabeld plasmodium. Het bleek nu dat het pulse-gelabeld materiaal gemiddeld een iets grotere sedimentatiesnelheid had dan het continu gelabelde. Werd na de pulse-labeling nog een chase-periode toegepast van 60 minuten, dan bleken de sedimentatiepatronen van pulse- en continu gelabeld materiaal samen te vallen. Brewer schrijft de snellere sedimentatie van het pulse-gelabeld materiaal niet toe aan een replicatiecomplex, maar hij neemt aan dat de

sneller sedimenterende fractie bestaat uit replicatievorken, die een hoger molecuulgewicht zouden hebben dan niet-replicerend DNA. Een dergelijke verklaring is ook voor ons experiment niet uitgesloten.

VERSCHILLENDE EFFECT VAN CYCLOHEXIMIDE OP DE SYNTHESE VAN CHROMOSOMAAL DNA EN  
NUCLEOLAIR EN MITOCHONDRIAAL DNA

A. Inleiding

De DNA-synthese van Physarum polycephalum gedurende de S-fase wordt sterk onderdrukt door de aanwezigheid van cycloheximide (Cummins en Rusch, 1966; Muldoon et al., 1971). De primaire werking van cycloheximide is de blokkering van de cytoplasmatische eiwitsynthese (McKeehan en Hardesty, 1969; Siegel en Sisler, 1964). Onderzoekingen aan gist (Grossman et al., 1969) en Chlorella (Wanka en Moors, 1970; Wanka et al., 1972B) hebben aangetoond dat door stop-zetting van de cytoplasmatische eiwitsynthese tijdens de S-fase de aanmaak van het kern-DNA verhinderd wordt, terwijl daarentegen de synthese van satelliet-DNA kan blijven plaats vinden zonder dat tegelijkertijd eiwitsynthese optreedt. Naar aanleiding van dit gegeven werd verondersteld dat voor de synthese van kern-DNA gelijktijdige aanmaak van specifieke eiwitten noodzakelijk is, terwijl dat niet het geval is voor de synthese van satelliet-DNA.

Het onafhankelijke gedrag van het satelliet-DNA zou echter ook verklaard kunnen worden door het feit, dat het gelocaliseerd is in mitochondriën en chloroplasten.

Aangezien een van de satelliet-DNA's van Physarum polycephalum in de kern gelocaliseerd is - het nucleolaire DNA (Guttes et al., 1969) - en ook gedurende de G2-fase gesynthetiseerd wordt (Holt en Gurney, 1969; Braun en Evans, 1969), is het mogelijk deze laatste verklaring te toetsen door het effect van cycloheximide op de synthese van het nucleolaire DNA na te gaan.

B. Resultaten

Het effect van cycloheximide op de synthese van DNA gedurende de S-fase werd nagegaan door het volgende experiment: een continu gelabeld plasmodium werd 25 minuten na M II in twee stukken verdeeld. Het ene stuk werd verder gekweekt op



medium waaraan  $^3\text{H}$ -TdR was toegevoegd, het andere stuk werd op medium verder gekweekt dat behalve  $^3\text{H}$ -TdR ook cycloheximide bevatte. Na een uur werden de stukken van het filtreerpapier geschrapt. Na fenolextractie werden de nucleïnezuren aan dichtheidsanalyse onderworpen zoals beschreven is in hoofdstuk II.

Zoals blijkt uit figuur 8 is de incorporatie van TdR in DNA in de met cycloheximide behandelde cultuur slechts ongeveer 10% van die van de controle. Of er in de aanwezigheid van cycloheximide synthese van satelliet-DNA heeft plaats gevonden, is vanwege de geringe hoeveelheid geïncorporeerde label niet duidelijk vast te stellen.

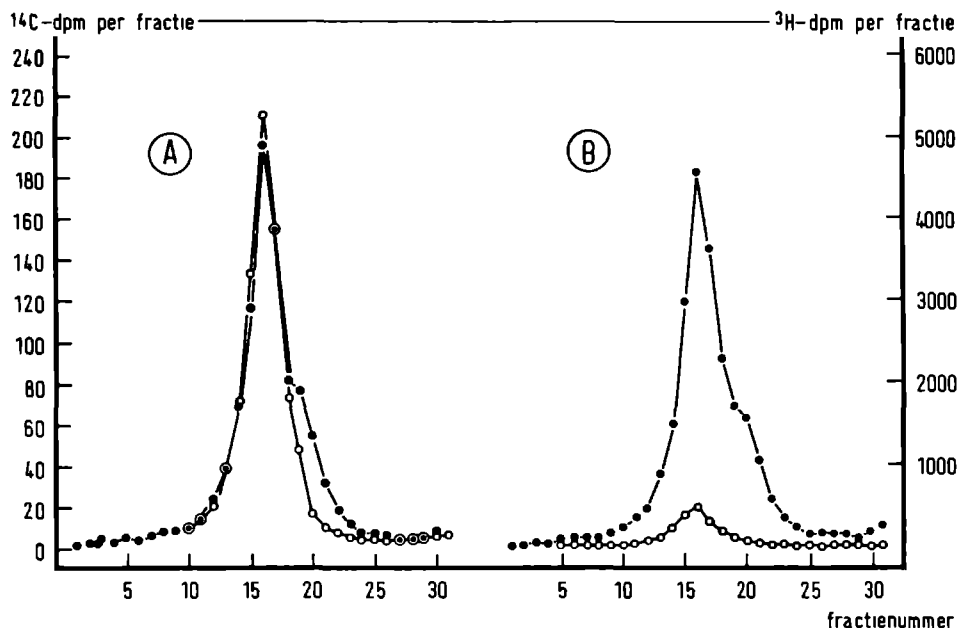
Het effect van cycloheximide op de DNA-synthese in de G2-fase werd nagegaan door een plasmodium op analoge wijze te behandelen als in het vorige experiment (figuur 9). Het blijkt nu dat in de met cycloheximide behandelde cultuur de incorporatie van TdR in de beide satelliet-DNA's ongeveer 60% is van die in de controle-cultuur. Deze lichte vermindering van de incorporatie zou verklaard kunnen worden door aan te nemen dat - zoals dat bij Chlorella (Wanka et al., 1972A) het geval is - in aanwezigheid van cycloheximide de endogene nucleotidenpool toeneemt, hetgeen verdunning van de toegevoegde label tot gevolg heeft.

De conclusie die dan ook uit deze experimenten getrokken kan worden is, dat de synthese van chromosomaal DNA wel, de synthese van nucleolair en mitochondriaal DNA niet geremd wordt door de aanwezigheid van cycloheximide.

Bij beschouwing van de verdeling van de radioactiviteiten over de gradienten valt op dat - behalve een geringe aanduiding in figuur 9 - in geen enkel preparaat sprake is van LS-DNA. Aangezien het enige belangrijke verschil in procedure tussen deze experimenten en die van de hoofdstukken III en VI het feit is dat er nu fenolextractie is toegepast, moet worden aangenomen dat het LS-DNA tijdens de fenolextractie verloren is gegaan.

### C. Discussie

Het resultaat van deze experimenten stemt volledig overeen met de uit de



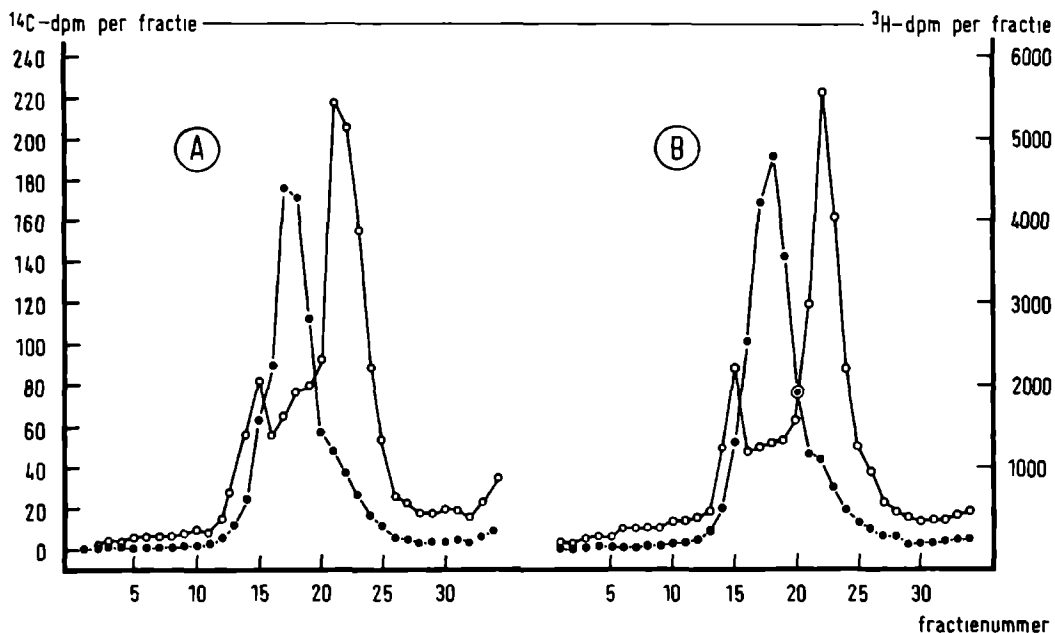
Figuur 8: Het effect van cycloheximide op de incorporatie van TdR in DNA tijdens de S-fase.

Een met  $^{14}\text{C}$ -TdR continu gelabeld plasmodium werd 25 minuten na M II in twee gelijke stukken verdeeld. Stuk A werd verder gekweekt op medium, waaraan  $^3\text{H}$ -TdR was toegevoegd (10  $\mu\text{C}/\text{ml}$ ); stuk B werd verder gekweekt op medium, waaraan behalve de gegeven hoeveelheid  $^3\text{H}$ -TdR ook nog cycloheximide was toegevoegd tot een concentratie van 50  $\mu\text{M}$ . Na een uur werden de stukken van het filtreerpapier geschrapt. Na fenolextractie werden de nucleïnezuren aan dichtheidsanalyse onderworpen zoals beschreven is in hoofdstuk II.

De gradienten zijn omgerekend tot een totaal van 1000 dpm  $^{14}\text{C}$  per gradient.

Fractie 1 is de bodem van de gradient.

●—● dpm  $^{14}\text{C}$     ○—○ dpm  $^3\text{H}$



Figuur 9: Het effect van cycloheximide op de incorporatie van TdR in DNA tijdens de G2-fase.

Een met  $^{14}\text{C}$ -TdR continu gelabeld plasmodium werd 6 uur na M II in twee gelijke stukken verdeeld. Stuk A werd verder gekweekt op medium dat 100  $\mu\text{C}$   $^3\text{H}$ -TdR per ml bevatte; stuk B werd verder gekweekt op medium waaraan behalve de gegeven hoeveelheid  $^3\text{H}$ -TdR ook nog 50  $\mu\text{M}$  cycloheximide was toegevoegd. Na een uur werden de stukken van het filtreerpapier geschraapt. Na fenolextractie werden de nucleinezuren aan dichtheidsanalyse onderworpen zoals beschreven is in hoofdstuk II.

De gradienten zijn omgerekend tot een totaal van 1000 dpm  $^{14}\text{C}$  per gradient.

Fractie 1 is de bodem van de gradient.

●—● dpm  $^{14}\text{C}$       ○—○ dpm  $^3\text{H}$

literatuur hierover bekende gegevens van gist (Grossman et al., 1969) en Chlorella (Wanka en Moors, 1970). Bovendien is aangetoond dat het verschillende effect van cycloheximide op de synthese van chromosomaal DNA en de andere DNA's - althans in Physarum polycephalum - niet kan worden toegeschreven aan de localisatie in verschillende organellen, daar het chromosomale DNA en het nucleolair DNA beide in de kern gelocaliseerd zijn. Daar zowel de synthese van nucleolair DNA als die van mitochondriaal DNA onafhankelijk is van gelijktijdig optredende cytoplasmatische eiwitsynthese, wordt de opvatting gesteund, dat de gevoeligheid voor cycloheximide van de synthese van het chromosomaal DNA berust op de specifieke structuur van de chromosomen.

Volgens Cummins en Rusch (1966) en Muldoon en medewerkers (1971) vindt de synthese van het chromosomale DNA van Physarum plaats in opeenvolgende stappen. Elke synthese-stap wordt gereguleerd door specifieke eiwitten, die pas gesynthetiseerd worden als de vorige synthese-stap voltooid is. Om deze reden treedt geen accumulatie van deze eiwitten op wanneer de DNA-synthese geremd wordt door fluoro-uridine (Cummins en Rusch, 1966).

Bij Chlorella daarentegen is de continuering van de synthese van het kern-DNA afhankelijk van de synthese van specifieke eiwitten waarvan de synthese doorgaat als de DNA-synthese geremd wordt met hydroxyureum (Wanka et al., 1972B). Het feit dat de synthese van mitochondriaal en nucleolair DNA onafhankelijk is van gelijktijdig optredende eiwitsynthese doet vermoeden dat geen van beide boven geschetste mechanismen betrokken is bij de regulatie van de synthese van deze DNA's.

ENIGE BIOLOGISCHE EXPERIMENTEN OMTRENT HET LS-DNAA. Inleiding

In hoofdstuk III is reeds naar voren gekomen dat in de kerncyclus van Physarum polycephalum gedurende de G2-fase na labeling met  $^3\text{H}$ -TdR niet alleen de uit de literatuur (Braun en Evans, 1969; Holt en Gurney, 1969) bekende satelliet-DNA-fracties radioactief worden, maar ook nog een andere fractie. Deze fractie - het LS-DNA - onderscheidt zich van de drie reeds bekende DNA-fracties door een zeer geringe sedimentatiesnelheid en een zeer lage zweef-dichtheid. Het in hoofdstuk III gepresenteerde experiment (zie figuren 4 en 5) wekte sterk het vermoeden, dat het LS-DNA voornamelijk in de G2-fase gesynthetiseerd zou worden. In dit hoofdstuk is nauwkeuriger nagegaan of er periodiciteit bestaat in de synthese van LS-DNA. Tevens is onderzocht hoe stabiel het LS-DNA in vivo is.

Ook is het effect van cycloheximide en ethidiumbromide op de aanmaak van LS-DNA nagegaan. Aanwezigheid van cycloheximide verhindert de synthese van chromosomaal DNA (Cummins en Rusch, 1966; Muldoon et al., 1971), doch laat de synthese van nucleolair en mitochondriaal DNA (zie hoofdstuk V) toe. Van ethidiumbromide is bekend, dat het de synthese van chromosomaal DNA en nucleolair DNA niet verhindert, maar de synthese van mitochondriaal DNA specifiek remt (Horwitz en Holt, 1971).

Misschien kan het resultaat van het in de vorige alinea genoemde experiment een aanduiding geven over de structuur van het LS-DNA en de regulatie van de synthese ervan.

B. ResultatenSynthese van LS-DNA in de kerncyclus

Om te zien of de synthese van LS-DNA over de hele G2-fase met gelijke snelheid verloopt, dan wel fluctuaties vertoont, is het volgende experiment uitge-

voerd. Van een met  $^{14}\text{C}$ -TdR continu gelabeld plasmodium werd tussen M II en M III op gezette tijden (zie figuur 10) een deel gedurende 10 minuten gekweekt op medium waaraan  $^3\text{H}$ -TdR was toegevoegd. Na deze pulse werd het stuk plasmodium gelyseerd en van het lysaat werd 1 ml gecentrifugeerd over een lineaire saccharose-gradiënt.

Uit het resultaat van het experiment blijkt dat de S-fase na M II ongeveer  $2\frac{1}{2}$  uur geduurd heeft en dat de tijdsduur tussen M II en M III 8 uur bedragen heeft. In de beide monsters die in het begin van een S-fase genomen zijn (M II +  $\frac{1}{2}$  hr; M III) valt geen synthese van LS-DNA waar te nemen. In de andere monsters is dit wel het geval, maar het blijkt duidelijk dat pas gedurende de laatste twee uur voor de mitose de grootste incorporatie van  $^3\text{H}$ -TdR in het LS-DNA heeft plaats gevonden.

De conclusie, die uit dit experiment getrokken kan worden, is: gedurende de hele G2-fase vindt enige synthese van LS-DNA plaats, maar in de laatste twee uur van de cyclus vindt de synthese van het merendeel van het LS-DNA plaats. De synthese van LS-DNA houdt op zodra de volgende mitose aanbreekt, en komt pas weer op gang tijdens of na afloop van de daarop volgende S-fase.

#### Stabiliteit van het LS-DNA in vivo

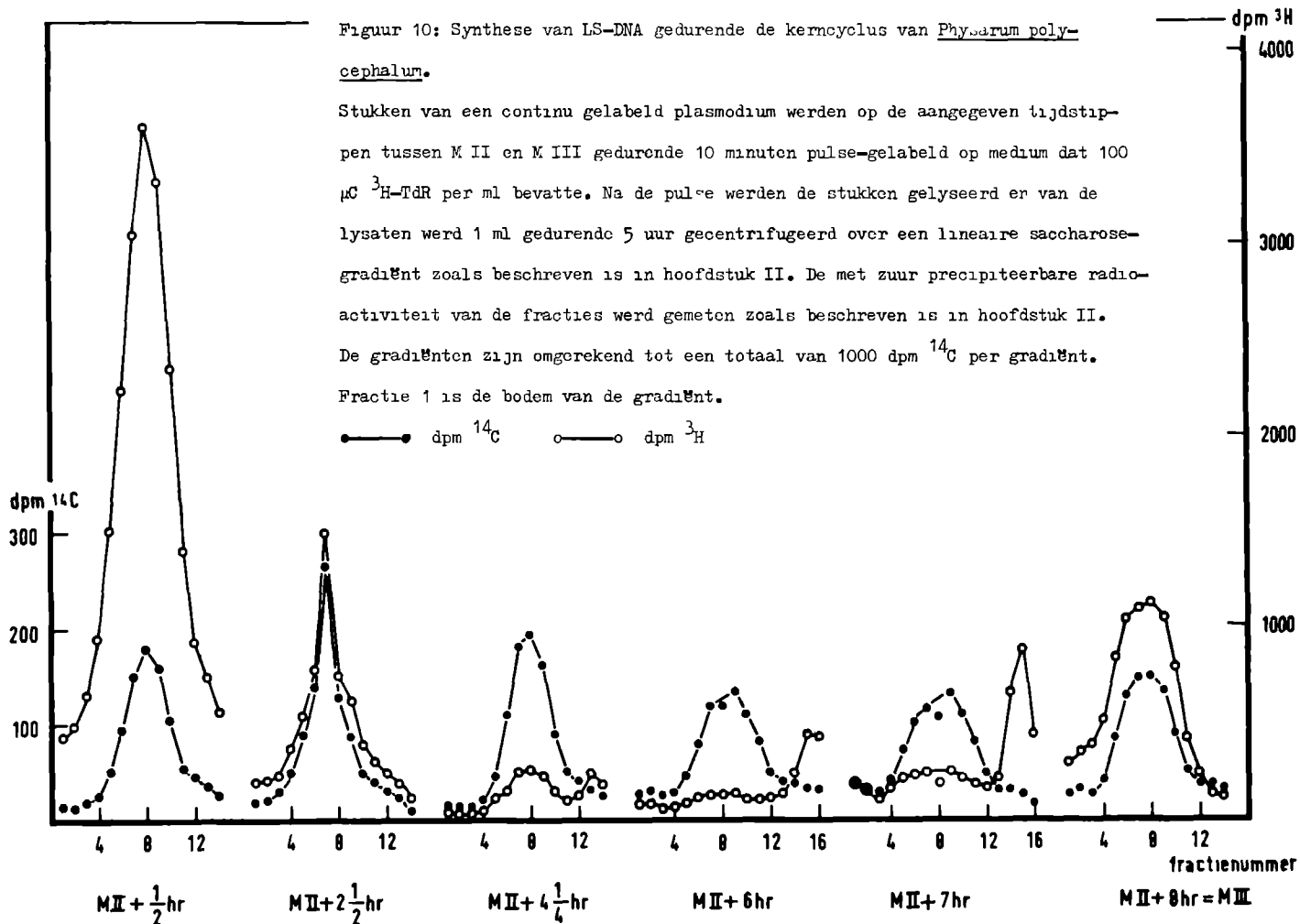
Het volgende experiment is uitgevoerd om te achterhalen of eenmaal gevormd LS-DNA in de loop van de volgende kerncyclus nog veranderingen ondergaat wat betreft zijn sedimentatie-eigenschappen. Gedurende 20 minuten in de late G2-fase werd een met  $^{14}\text{C}$ -TdR continu gelabeld plasmodium pulse-gelabeld met  $^3\text{H}$ -TdR. Na de pulse werd het plasmodium verder gekweekt op niet-radioactief medium. Er werd drie maal een gedeelte van het plasmodium gelyseerd, namelijk op het tijdstip van mitose, aan het einde van de daarop volgende S-fase en midden in de weer daarop volgende G2-fase. Elk lysaat werd gecentrifugeerd over een lineaire saccharose-gradiënt.

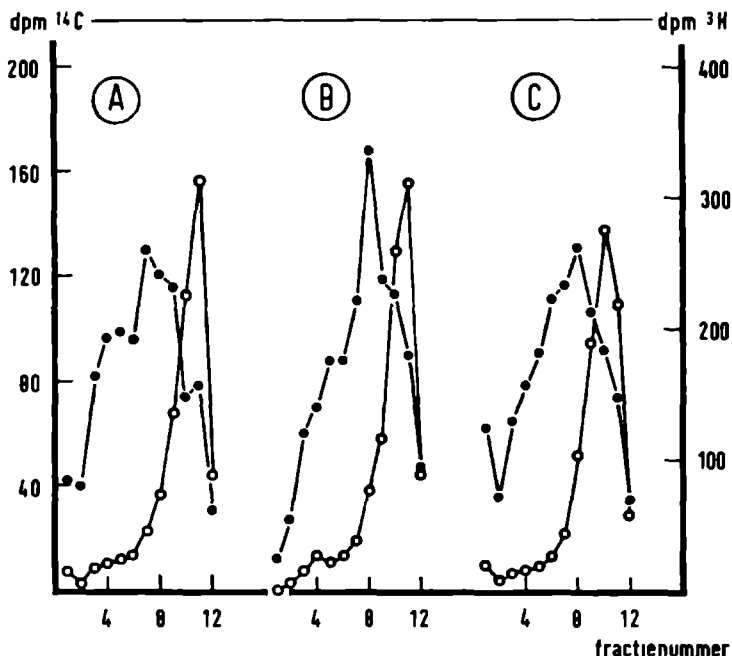
Hoewel de scheiding tussen het LS-DNA en het overige DNA - zoals te zien is aan de verdeling van de  $^{14}\text{C}$ -activiteit over de gradiënten - niet optimaal is, kan toch met zekerheid vastgesteld worden dat het LS-DNA - althans wat zijn

Figuur 10: Synthese van LS-DNA gedurende de kerncyclus van Physarum polycephalum.

Stukken van een continu gelabeld plasmodium werden op de aangegeven tijdstippen tussen M II en M III gedurende 10 minuten pulse-gelabeld op medium dat 100  $\mu\text{C}$   $^3\text{H}$ -TdR per ml bevatte. Na de pulse werden de stukken gelyseerd en van de lysaten werd 1 ml gedurende 5 uur gecentrifugeerd over een lineaire saccharose-gradiënt zoals beschreven is in hoofdstuk II. De met zuur precipiteerbare radioactiviteit van de fracties werd gemeten zoals beschreven is in hoofdstuk II. De gradiënten zijn omgerekend tot een totaal van 1000 dpm  $^{14}\text{C}$  per gradiënt. Fractie 1 is de bodem van de gradiënt.

● — ● dpm  $^{14}\text{C}$     ○ — ○ dpm  $^3\text{H}$





Figuur 11: Stabiliteit in vivo van het LS-DNA.

Een continu gelabeld plasmodium werd van M II - 60' tot M II - 40' pulse-  
gelabeld op medium dat  $10 \mu\text{C } ^3\text{H-TdR/ml}$  bevatte. Na de pulse werd het plasmodium  
verder gekweekt op niet-radioactief medium. Op het tijdstip M II (A), M II +  
90' (B) en M II + 5 uur (C) werd een deel van het plasmodium gelyseerd en van  
het lysaat werd 1 ml gedurende 5 uur gecentrifugeerd over een lineaire saccha-  
rose-gradiënt zoals beschreven is in hoofdstuk II. De met zuur precipiteerbare  
radioactiviteit van de fracties werd gemeten zoals beschreven is in hoofdstuk  
II. De gradiënten zijn omgerekend tot een totaal van  $1000 \text{ dpm } ^{14}\text{C}$  per gradiënt.  
Fractie 1 is de bodem van de gradiënt.

●—● dpm  $^{14}\text{C}$       ○—○ dpm  $^3\text{H}$



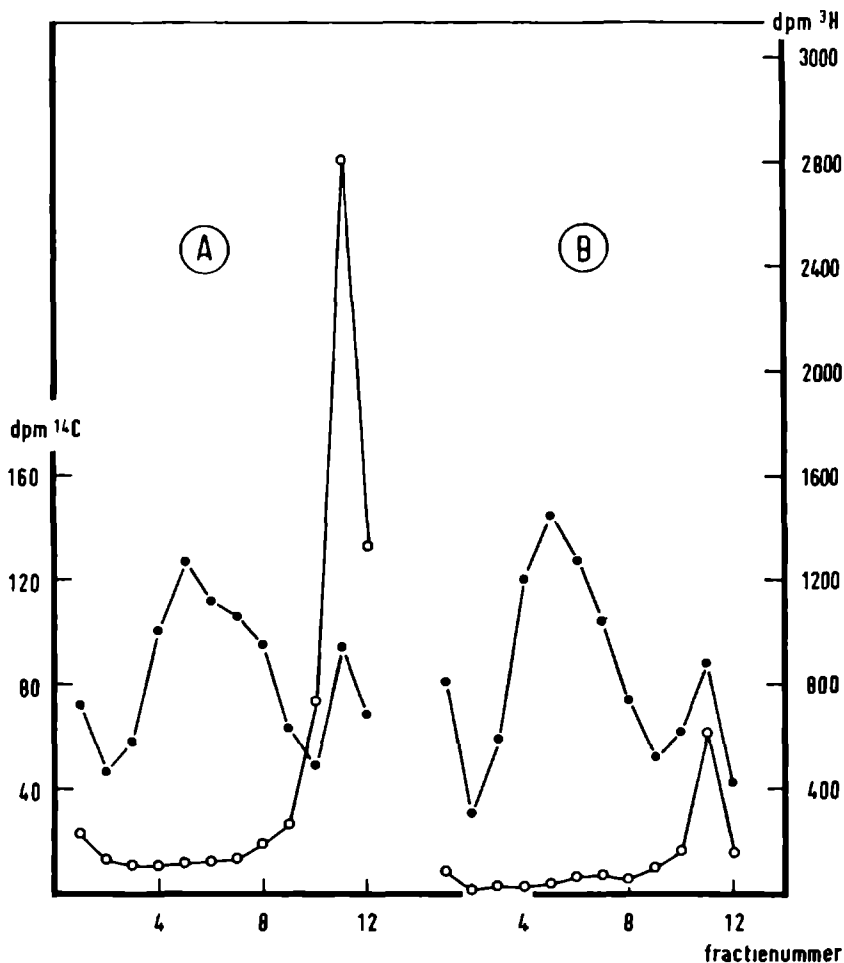
sedimentatie-eigenschappen betreft - stabiel is (figuur 11).

#### Effect van cycloheximide en ethidiumbromide op de synthese van het LS-DNA

Zoals in de inleiding van dit hoofdstuk reeds gesteld is, wordt de aanmaak van chromosomaal DNA geremd wanneer de cytoplasmatische eiwitsynthese door cycloheximide stopgezet wordt (Cummins en Rusch, 1966; Muldoon et al., 1971), terwijl de synthese van het mitochondriale en nucleolaire DNA doorgaat. Door het effect van cycloheximide op de synthese van het LS-DNA na te gaan, kan achterhaald worden of ook de aanmaak van LS-DNA al of niet afhankelijk is van tegelijkertijd optredende synthese van cytoplasmatische eiwitten. Daartoe is het volgende experiment uitgevoerd: een met  $^{14}\text{C}$ -TdR continu gelabeld plasmodium werd twee uur voor M III in twee gelijke stukken verdeeld. Stuk A werd verder gekweekt op medium, waaraan  $^3\text{H}$ -TdR was toegevoegd ( $10\text{ }\mu\text{C/ml}$ ), stuk B werd verder gekweekt op medium, waaraan behalve de gegeven hoeveelheid  $^3\text{H}$ -TdR ook nog cycloheximide was toegevoegd tot een concentratie van  $50\text{ }\mu\text{M}$ . Op het tijdstip van M III in stuk A werden de twee stukken gelyseerd en de lysaten werden gecentrifugeerd over een lineaire saccharose-gradiënt. Uit het resultaat (figuur 12) blijkt dat de synthese van LS-DNA - evenals dat het geval is met de synthese van het chromosomale DNA - geremd wordt, wanneer de cytoplasmatische eiwitsynthese geremd wordt. In stuk B werd geen mitose waargenomen. Dit is in overeenstemming met de bevinding van Cummins en medewerkers (1965), dat in aanwezigheid van cycloheximide de mitose niet kan plaats vinden.

Het effect van ethidiumbromide op de DNA-synthese in de G2-fase is nagegaan in het volgende experiment. Een met  $^{14}\text{C}$ -TdR continu gelabeld plasmodium werd 5 uur na M III in twee gelijke stukken verdeeld. Stuk A werd verder gekweekt op medium waaraan  $40\text{ }\mu\text{C/ml}$   $^3\text{H}$ -TdR was toegevoegd, stuk B op medium, waaraan behalve de gegeven hoeveelheid  $^3\text{H}$ -TdR ook nog ethidiumbromide was toegevoegd tot een concentratie van  $20\text{ }\mu\text{M}$ . Na drie uur werden de beide stukken gelyseerd. De lysaten werden gecentrifugeerd over een lineaire saccharose-gradiënt. De sedimentatiepatronen zijn weergegeven in figuur 13.

Het blijkt, dat de totale incorporatie van  $^3\text{H}$ -TdR in met zuur precipiteerbaar



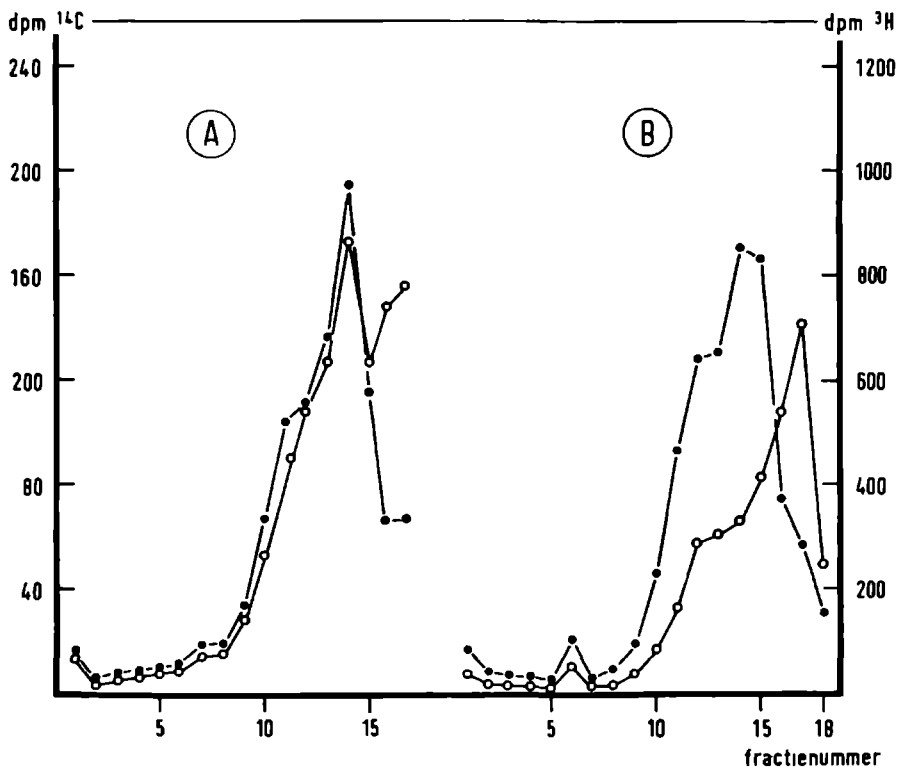
Figuur 12: De invloed van cycloheximide op de synthese van LS-DNA.

Een continu gelabeld plasmodium werd twee uur voor M III in twee stukken verdeeld. Stuk A werd verder gekweekt op medium, waaraan  $10 \mu\text{C}/\text{ml}$   $^3\text{H}$ -TdR was toegevoegd, stuk B werd verder gekweekt op medium waaraan behalve de gegeven hoeveelheid  $^3\text{H}$ -TdR ook nog cycloheximide was toegevoegd tot een concentratie van  $50 \mu\text{M}$ . Op het tijdstip van M III werden de stukken gelyseerd en van de lysaten werd  $1 \text{ ml}$  gedurende  $5$  uur gecentrifugeerd over een lineaire saccharose-gradiënt zoals beschreven is in hoofdstuk II. De met zuur precipiteerbare radioactiviteit van de fracties werd gemeten zoals beschreven is in hoofdstuk II.

De gradiënten zijn omgerekend tot een totaal van  $1000 \text{ dpm } ^{14}\text{C}$  per gradiënt.

Fractie 1 is de bodem van de gradiënt.

●—●  $\text{dpm } ^{14}\text{C}$       ○—○  $\text{dpm } ^3\text{H}$



Figuur 13: Het effect van ethidiumbromide op de DNA-synthese in de G2-fase.

Een continu gelabeld plasmodium werd 5 uur na M III in twee stukken verdeeld.

Stuk A werd verder gekweekt op medium waaraan 40  $\mu\text{C}/\text{ml}$   $^3\text{H}\text{-TdR}$  was toegevoegd.

Stuk B werd verder gekweekt op medium waaraan, behalve de aangegeven hoeveelheid

$^3\text{H}\text{-TdR}$ , ethidiumbromide was toegevoegd tot een concentratie van 20  $\mu\text{M}$ . Na drie

uur werden de stukken gelyseerd en van de lysaten werd 1 ml gecentrifugeerd

zoals beschreven is in hoofdstuk II. De met zuur precipiteerbare radioactiviteit van de fracties werd gemeten zoals beschreven is in hoofdstuk II.

De gradienten zijn omgerekend tot een totaal van 1000 dpm  $^{14}\text{C}$  per gradient.

Fractie 1 is de bodem van de gradient.

●—● dpm  $^{14}\text{C}$       ○—○ dpm  $^3\text{H}$

materiaal in de cultuur, gekweekt in aanwezigheid van ethidiumbromide, sterk verminderd is ten opzichte van de controle-cultuur. Dit moet worden toegeschreven aan remming van de mitochondriale DNA-synthese, zoals door Horwitz en Holt (1971) beschreven is. Op de incorporatie in het LS-DNA lijkt de aanwezigheid van ethidiumbromide geen invloed te hebben gehad.

### C. Discussie

Het is in dit hoofdstuk gebleken dat de synthese van LS-DNA voornamelijk plaats vindt gedurende ongeveer twee uur onmiddellijk voorafgaande aan de mitose. Dit wijst er op dat de incorporatie van  $^3\text{H}$ -TdR in deze fractie niet berust op specifieke, Sarkosyl-resistente adsorptie aan een of andere met zuur precipiteerbare plasmodium-component. Ook het feit, dat de incorporatie van  $^3\text{H}$ -TdR in het LS-DNA geremd wordt door de aanwezigheid van cycloheximide wijst in die richting. Het kan op dit moment echter niet worden uitgesloten dat de waargenomen sterke incorporatie van  $^3\text{H}$ -TdR in de LS-DNA-fractie misschien toch berust op de synthese van een stof, waaraan  $^3\text{H}$ -TdR - of met  $^3\text{H}$  gelabeld DNA - Sarkosyl-resistent gebonden wordt.

Juist het feit dat het LS-DNA vlak voor het begin van de mitose gesynthetiseerd wordt, doet het vermoeden rijzen dat het hier gaat om een precursor of regulator, die in voldoende mate aanwezig moet zijn, wil de mitose kunnen beginnen. Door Oppenheim en Katzir (1971) is aangetoond, dat gedurende de G2-fase een factor in activiteit toeneemt, die in staat is de mitose te vervroegen wanneer hij - na extractie - wordt toegediend aan een plasmodium, dat in het begin van de G2-fase verkeert. Mogelijk is het door ons gevonden LS-DNA verantwoordelijk voor de door Oppenheim en Katzir (1971) gevonden activiteit.

Uitgaande van het bovenstaande is het mogelijk het effect van cycloheximide op de mitose - zoals onderzocht door Cummins en medewerkers (1965) - te interpreteren als het gevolg van het feit, dat LS-DNA in aanwezigheid van cycloheximide niet wordt aangemaakt. Cummins en medewerkers vonden dat de mitose niet plaats kon vinden, als cycloheximide aan het plasmodium werd toegevoegd in de G2-fase. Werd het cycloheximide echter minder dan 15 minuten voor de metafase

toegevoegd, dan trad wel mitose op, maar deze nam dan veel meer tijd in beslag als in normale omstandigheden. Deze remming en vertraging werd door Cummins en medewerkers toegeschreven aan het feit dat in aanwezigheid van cycloheximide eiwitten, die nodig zijn voor het starten en completeren van de mitose, niet aangemaakt worden. Daar ook de synthese van het LS-DNA door cycloheximide geremd wordt, kan het niet uitgesloten geacht worden, dat - tenminste voor een deel - het effect van cycloheximide op de mitose berust op het feit, dat er niet voldoende LS-DNA is aangemaakt.

Een mogelijke functie van het LS-DNA met betrekking tot de synthese van het chromosomale DNA kan niet worden uitgesloten; de enige aanleiding echter om een dergelijke functie te veronderstellen is het feit dat het LS-DNA voornamelijk vlak voor het begin van de S-fase wordt gesynthetiseerd. In ieder geval staat vast dat het LS-DNA niet op een zodanige manier aan het chromosomale DNA gebonden - of er in geïncorporeerd - wordt, dat het na lyse van het plasmodium met het chromosomale DNA cosedimenteert.

Bij Physarum polycephalum heeft ethidiumbromide een remmend effect op de synthese van mitochondriaal DNA, maar laat de synthese van chromosomaal en nucleolair DNA ongemoeid (Horwitz en Holt, 1971). Ook in in vitro gekweekte zoogdiercellen (Nass, 1972) en gist (Goldring et al., 1970) is dat het geval. Het verschillende effect van ethidiumbromide kan waarschijnlijk worden toegeschreven aan structurele verschillen tussen chromosomaal en mitochondriaal DNA. Ethidiumbromide bindt zich intercalair aan DNA; bij circulair DNA heeft dit een verandering van het aantal "supercoils" (Radloff et al., 1967; Bauer en Vinograd, 1968) tot gevolg. Daar het mitochondriale DNA van gist (Hollenberg et al., 1970) en dat van HeLa-cellen (Leibowitz, 1970) en andere in vitro gekweekte zoogdiercellen (Nass, 1972) circulair is, is het waarschijnlijk dat het effect van ethidiumbromide op de synthese van het mitochondriale DNA juist berust op het feit dat dit DNA circulair is. Het mitochondriale DNA van Physarum kon weliswaar niet als circulair DNA geïsoleerd worden, maar de heterogeniteit van de geïsoleerde moleculen en het variabele aantal enkelstreng-breuken er in deden vermoeden, dat het geïsoleerde mitochondriale DNA een afbraakproduct van

circulaire DNA-moleculen zou kunnen zijn (Sonenshein en Holt, 1968). Uit het feit dat de synthese van LS-DNA niet door ethidiumbromide geremd wordt, kan derhalve de conclusie getrokken worden, dat het LS-DNA hoogstwaarschijnlijk geen circulaire structuur heeft.

EEN POGING TOT BIOCHEMISCHE KARAKTERISERING VAN HET LS-DNAA. Inleiding

In de hoofdstukken III en VI is reeds naar voren gekomen dat in de kerncyclus van Physarum polycephalum gedurende de G2-fase na labeling met  $^3\text{H}$ -TdR niet alleen de uit de literatuur (Holt en Gurney, 1969; Braun en Evans, 1969) bekende satelliet-DNA-fracties radioactief worden, maar ook nog een andere fractie - het LS-DNA - die zich in de drie volgende opzichten onderscheidt van de rest van het Physarum-DNA:

- 1) De sedimentatiesnelheid van het LS-DNA is veel lager dan die van de rest van het Physarum-DNA.
- 2) De synthese van het LS-DNA vindt voornamelijk plaats gedurende ongeveer twee uur onmiddellijk voorafgaande aan de mitose.
- 3) De zweefdichtheid van het LS-DNA is veel lager dan die van de rest van het Physarum-DNA.

Bij de door ons toegepaste centrifugatiemethode heeft de bovengrens van de CsCl-gradiënt een dichtheid van ongeveer  $1,65 \text{ g/cm}^3$ . De zweefdichtheid van het LS-DNA is dus - gezien het feit dat het zich tijdens de centrifugatie ophoopt helemaal boven op de gradiënt - kleiner of gelijk aan  $1,65 \text{ g/cm}^3$ . Daar zuiver DNA - welke basensamenstelling het ook moge hebben - een zo lage zweefdichtheid niet heeft, ligt de gevolgtrekking voor de hand dat het gedrag van LS-DNA in de CsCl-gradiënt veroorzaakt zou kunnen worden doordat het LS-DNA niet alleen bestaat uit DNA, maar uit nog een of meer andere componenten die verantwoordelijk zijn voor deze lage zweefdichtheid. Verder blijkt uit de geringe sedimentatiesnelheid dat het LS-DNA een betrekkelijk klein molecuul moet zijn.

In dit hoofdstuk worden experimenten beschreven die tot doel hadden nadere gegevens te verschaffen over de structuur van het LS-DNA. Vooral was het de bedoeling na te gaan of het LS-DNA - al of niet mede - uit DNA bestaat.

## B. Resultaten

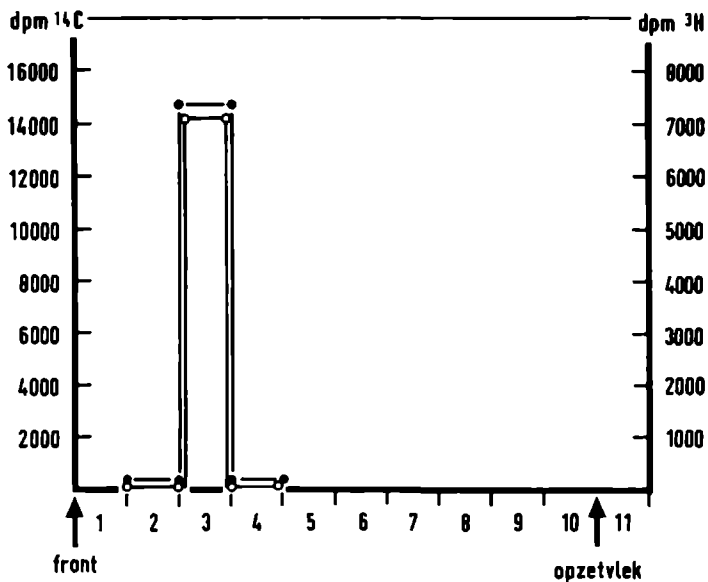
### Radioactiviteit van LS-DNA is aan thymine gebonden

Het kan niet uitgesloten worden geacht - ook omdat dit door Holt en Gurney (1969) reeds is waargenomen - dat *Physarum polycephalum* extern aangeboden TdR kan afbreken en de afbraakproducten gebruiken voor de synthese van andere plasmodiale componenten dan alleen DNA. Het is daarom noodzakelijk na te gaan of de  $^3\text{H}$ -activiteit die in het LS-DNA wordt aangetroffen inderdaad aan thymine gebonden is.

Hiertoe is het volgende experiment uitgevoerd. Een met  $^{14}\text{C}$ -TdR continu gelabeld plasmodium werd van M III - 75 minuten tot M III pulse-gelabeld met  $^3\text{H}$ -TdR. Na lyse van het plasmodium werd drie maal 1 ml van het lysaat gecentrifugeerd over een lineaire saccharose-gradient en de LS-DNA bevattende fracties werden samengevoegd. Het LS-DNA werd met behulp van PCA geprecipiteerd en vier maal met alcohol 70% gewassen, zodat alle niet-geïncorporeerd TdR verwijderd was. Na wegdampen van de alcohol werd het neerslag, samen met een hoeveelheid  $^{14}\text{C}$ -TdR, opgenomen in 1 ml 6 N HCl. Het geheel werd nu onder stikstof gehydrolyseerd bij  $100^\circ\text{C}$  gedurende 16 uur. Na de hydrolyse werd het HCl weggedampt en het residu opgenomen in 0,5 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Dit mengsel werd gechromatografeerd op papier, dalend, met isopropanol-HCl- $\text{H}_2\text{O}$  (v/v/v = 170/41/39) (Fujisawa et al., 1959) als loopvloeistof. Uit het volledig samenvallen van de radioactiviteitspieken (zie figuur 14) bleek dat de in het LS-DNA geïncorporeerde  $^3\text{H}$ -activiteit aan thymine gebonden is.

De mogelijkheid dat, door gebruik van eventuele afbraakproducten van  $^{14}\text{C}$ - en  $^3\text{H}$ -TdR, op niet specifieke wijze stoffen zouden kunnen worden gelabeld met een lage sedimentatiesnelheid en een lage zweefdichtheid, is door dit experiment vrijwel geheel uitgesloten. Wel is de mogelijkheid vergroot dat het LS-DNA - mogelijk slechts voor een deel - uit DNA bestaat. Het definitieve bewijs hiervoor kan alleen maar geleverd worden door aan te tonen dat de  $^3\text{H}$ -activiteit van het LS-DNA in zuur oplosbaar gemaakt kan worden door behandeling met DNase.





Figuur 14: Papierchromatografie van LS-DNA na zure hydrolyse.

LS-DNA werd bereid en gehydrolyseerd zoals in de tekst beschreven is. Het hydrolysaat werd dalend gechromatografeerd op Whatman no. 1 papier met isopropanol-HCl-H<sub>2</sub>O als loopvloeistof. Na de chromatografie werd het chromatogram in stukken geknipt. De radioactiviteit werd gemeten door elk stuk in een telpotje over te brengen en 10 ml telvloeistof toe te voegen.

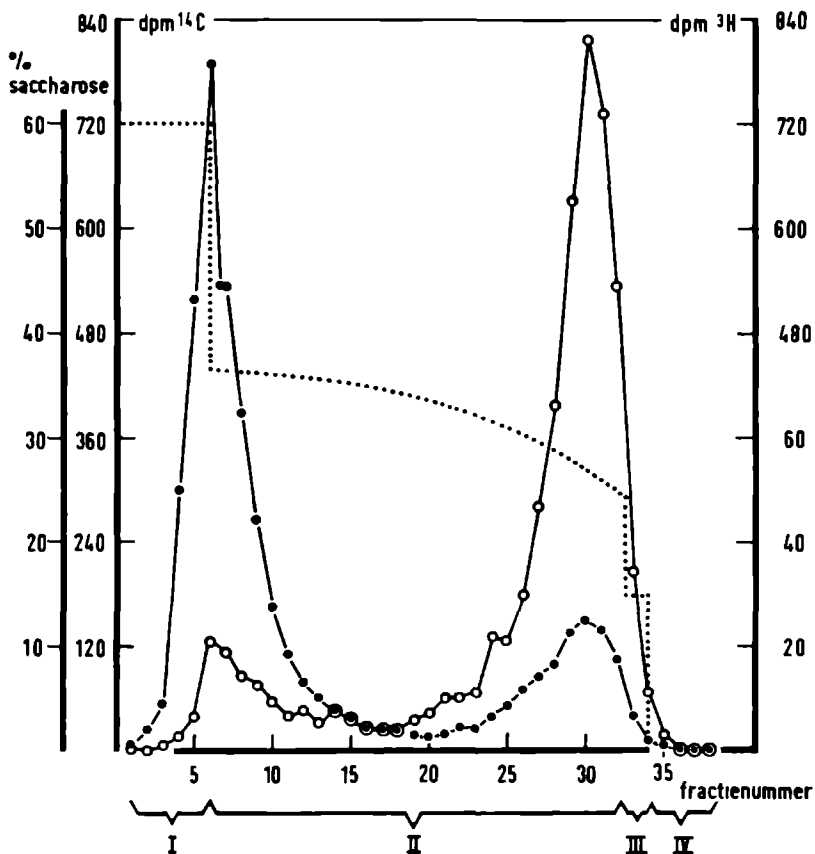
●—● dpm  $^{14}\text{C}$       ○—○ dpm  $^3\text{H}$

1) Zone-gradient centrifugatie

Om met betrouwbaar resultaat de werking van DNase op het LS-DNA te kunnen nagaan, moet aan twee eisen voldaan kunnen worden. Op de eerste plaats dient men over grotere hoeveelheden materiaal te kunnen beschikken dan mogelijk is door het bijeenvoegen van overeenkomstige fracties van uitzwaai-saccharose-gradiënten. Op de tweede plaats dient het LS-DNA volledig gescheiden te zijn van de andere DNA-fracties van Physarum polycephalum. Aan beide eisen bleek te kunnen worden voldaan wanneer het LS-DNA van de rest van het Physarum-DNA gescheiden werd met behulp van een saccharose-gradiënt van 24 tot 37% in de B XXX zone-rotor.

Een met  $^{14}\text{C}$ -TdR continu gelabeld plasmodium werd in de G2-fase gedurende 2 uur gelabeld met  $^3\text{H}$ -TdR. Na de pulse werd het plasmodium gelyseerd in 25 ml lysemedium. Het zo verkregen monster werd op 15% saccharose gebracht en in zijn geheel voor de centrifugatie gebruikt. Na de centrifugatie bleek dat het met zuur precipiteerbare materiaal in twee - vrijwel volledig gescheiden - fracties uiteen gevallen was: een snel sedimenterende fractie die de grootste  $^{14}\text{C}$ -activiteit bevat en een langzaam sedimenterende die de grootste hoeveelheid  $^3\text{H}$ -activiteit bevat (figuur 15).

Van beide fracties is een sedimentatie- en dichtheidsanalyse uitgevoerd om te zien in hoeverre ze identiek zijn met de fracties die verkregen worden door sedimentatie-analyse, zoals beschreven is in hoofdstuk III. Na centrifugatie over een lineaire saccharose-gradiënt van 12 tot 20% in de SW40-rotor, bleek de langzaam sedimenterende fractie ook nu een zeer geringe sedimentatiesnelheid te bezitten, terwijl de snel sedimenterende fractie even snel sedimenteerde als het "gewone" Physarum-DNA. Bij dichtheidsanalyse bleek de langzaam sedimenterende fractie boven op de CsCl-gradiënt terecht te komen, had dus een zeer geringe dichtheid, terwijl de snel sedimenterende fractie uit mitochondriaal en nucleolair DNA bleek te bestaan, althans de zich in deze fractie bevindende  $^3\text{H}$ -activiteit. De  $^{14}\text{C}$ -activiteit van de snel sedimenterende fractie bestond voornamelijk uit chromosomaal DNA. Het is dus gerechtvaardigd



I = kussen

III monster in 15% saccharose

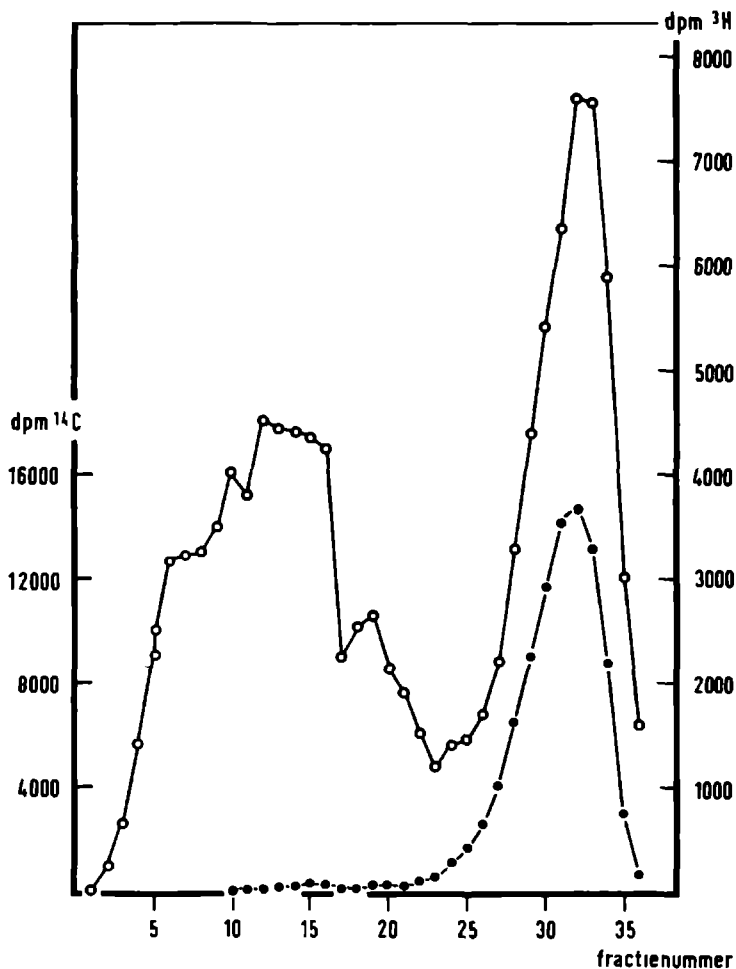
II = gradient

IV overlay

Figuur 15: Isolatie van LS-DNA door middel van zone-gradient centrifugatie.

Een met  $^{14}\text{C}$ -TdR continu gelabeld plasmodium werd van M III - 150' tot M III - 30' gekweekt op medium waaraan  $^3\text{H}$ -TdR was toegevoegd (5  $\mu\text{C}/\text{ml}$ ). Na de pulse werd het plasmodium gelyseerd in 25 ml lysemedium. Het lysaat werd in zijn geheel op een zone-gradient gebracht van 24 tot 37% saccharose, die gemaakt was op een kussen van 60% saccharose in de B XXX rotor. Na de centrifugatie (16 uur bij 40.000 rpm) werd de gradient uitgedrukt door inpersen van 70% saccharose. Fracties van ongeveer 14 ml werden opgevangen en de met zuur precipiteerbare radioactiviteit werd gemeten zoals beschreven is in hoofdstuk II. Fractie 1 is de bodem van de gradient.

●—● dpm  $^{14}\text{C}$     ○—○ dpm  $^3\text{H}$     ..... % saccharose



Figuur 16: Scheiding van LS-DNA en gewoon Physarum-DNA door middel van zone-gradient centrifugatie.

Een met  $^{14}\text{C}$ -lysine en  $^{14}\text{C}$ -threonine ( $0,125 \mu\text{C}/\text{ml}$  van elk) continu gelabeld plasmodium werd van M III - 3 uur tot M III gekweekt op medium, waaraan  $^3\text{H}$ -TdR was toegevoegd ( $25 \mu\text{C}/\text{ml}$ ). Na de pulse werd het plasmodium gelyseerd in 25 ml lysemedium en verder behandeld zoals beschreven is bij figuur 15.

Fractie 1 is de bodem van de gradient.

●—● dpm  $^{14}\text{C}$       ○—○ dpm  $^3\text{H}$

de in de zône-rotor langzaam sedimenterende fractie LS-DNA te noemen en de snel sedimenterende "gewoon" Physarum-DNA, waaronder verstaan wordt: chromosomaal, nucleolair en mitochondriaal DNA.

## 2) Behandeling met DEAE-cellulose

Zoals uit figuur 15 valt op te maken is met behulp van zône-gradient centrifugatie verkregen LS-DNA weliswaar volkomen vrij van "gewoon" Physarum-DNA, maar zal toch nog in sterke mate verontreinigd zijn met onder andere plasmodiale eiwitten, nucleïnezuurprecursoren - waaronder met  $^3\text{H}$  gelabelde -, pigmenten, Sarkosyl en een betrèkkelijk grote hoeveelheid saccharose. Om het LS-DNA zo veel mogelijk van deze stoffen te bevrijden werd na het centrifugeren een zuiveringsstap uitgevoerd met behulp van de ionenuitswisselaar DEAE-cellulose.

Een plasmodium werd met  $^{14}\text{C}$ -lysine en -threonine continu gelabeld om de eiwitten te labelen. Na pulse-labeling met  $^3\text{H}$ -TdR in de G2-fase werd het plasmodium gelyseerd en gecentrifugeerd als boven beschreven. De verdeling van de met zuur precipiteerbare radioactiviteit over de gradient is weergegeven in figuur 16. Zoals duidelijk te zien is, vertoont het LS-DNA hetzelfde sedimentatiegedrag als het grootste gedeelte van het plasmodiale  $^{14}\text{C}$ -gelabelde eiwit. Vanwege de zeer geringe hoeveelheid  $^{14}\text{C}$ -activiteit onder in de gradient zou men kunnen zeggen, dat het "gewone" Physarum-DNA eiwit vrij is.

Voor verdere behandeling werden de fracties 30 tot en met 33 samengevoegd. Het gezamenlijke volume was 75 ml. Aan het zo verkregen "ruwe" LS-DNA-preparaat werd 12 ml uitgezakte DEAE-cellulose toegevoegd dat geëquilibreerd was met 0,01 M Tris-HCl, 0,001 M EDTA, pH 7,5. Na 10 minuten zachtjes roeren werd het poeder afgecentrifugeerd en gewassen met 10 ml 0,01 M Tris-HCl, 0,001 M EDTA, pH 7,5. De beide zo verkregen supernatanten werden samengevoegd en de met zuur precipiteerbare radioactiviteit daarin werd gemeten, zijnde het niet aan DEAE-cellulose te binden materiaal. Achtereenvolgens werd nu de DEAE-cellulose uitgewassen met telkens 2 maal 10 ml van respectievelijk 0,35 M NaCl, 0,90 M NaCl en 1,50 M NaCl in 0,01 M Tris-HCl, 0,001 M EDTA,

pH 7,5. De eluaten van dezelfde NaCl-molariteit werden samengevoegd en de met zuur precipiteerbare radioactiviteit daarin werd gemeten. Behalve de radioactiviteit werd van elke fractie ook het eiwitgehalte gemeten volgens de methode van Lowry en medewerkers (1951). De gehele procedure werd uitgevoerd in de koelcel (4°C). Het resultaat van dit experiment is weergegeven in tabel 4, waarin de totale hoeveelheid geëluëerd materiaal per fractie is opgegeven als percentage van de hoeveelheid in het "ruwe" LS-DNA preparaat.

Tabel 4. DEAE-zuivering van het LS-DNA na zone-gradient centrifugatie.

fractie	% $^{14}\text{C}$ - activiteit	% $^3\text{H}$ - activiteit	% eiwit	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$	dpm $^3\text{H}$ per $\mu\text{g}$ eiwit
fr. 30t/m 33 van fig. 16	100,0	100,0	100,0	0,36	7,7
niet aan DEAE gebonden	6,4	2,5	29,4	0,14	0,6
0,35 M NaCl- eluaat	27,5	9,7	20,0	0,13	3,7
0,90 M NaCl- eluaat	63,2	58,2	46,8	0,33	9,5
1,50 M NaCl- eluaat	9,2	7,9	5,3	0,30	11,3

Het blijkt uit de tabel dat het overgrote deel van de elueerbare, met zuur precipiteerbare, radioactiviteit terecht gekomen is in de 0,9 M NaCl-fractie. In deze fractie bleek bij een controle-experiment ook via fenolextractie gezuiverd gewoon Physarum-DNA terecht te komen. Op onverklaarbare wijze is een betrekkelijk groot verlies van  $^3\text{H}$ -activiteit opgetreden. In alle experimenten is een dergelijk verlies - weliswaar variabel van omvang - opgetreden. Verlies van  $^{14}\text{C}$ -activiteit en eiwit treedt in het geheel niet op.

Zowel het  $^{14}\text{C}$ -gelabeld materiaal als het via de Lowry-methode te bepalen

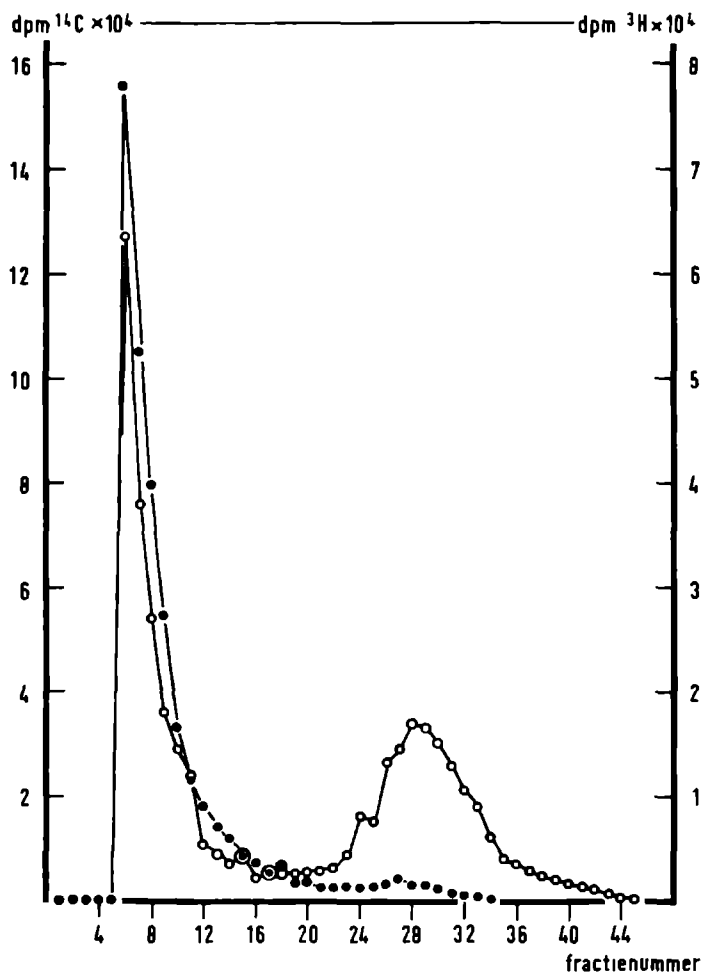
eiwit komt voor een groot gedeelte in het 0,9 M NaCl-eluaat terecht. Blijkbaar heeft dus een relatief groot gedeelte van het totale plasmodium-eiwit een betrekkelijk zuur karakter.

Een goede scheiding van het LS-DNA van eiwit lijkt niet te zijn opgetreden: de ratio  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  in het 0,9 M NaCl-eluaat verschilt nauwelijks van die in de ruwe LS-DNA-fractie, terwijl de ratio  $^3\text{H}$ /eiwit in het 0,9 M NaCl-eluaat slechts ongeveer 25% hoger is dan die in de ruwe LS-DNA-fractie. Waarschijnlijk wordt de totale hoeveelheid van het in de ruwe LS-DNA-fractie aanwezig saccharose, pigmenten en Sarkosyl of niet aan het DEAE-cellulose gebonden of komt in de 0,35 M NaCl-fractie terecht. Of het LS-DNA op deze wijze van nucleïnezuurprecursors bevrijd kan worden, kan niet met zekerheid gesteld worden, daar steeds een gedeelte van de  $^3\text{H}$ -activiteit in zuur oplosbaar bleef. Bij opslag van het 0,9 M NaCl-eluaat werd dat gedeelte langzamerhand groter; werd deze fractie bij  $37^\circ\text{C}$  geïncubeerd dan trad er zelfs een betrekkelijk snelle hydrolyse van het met zuur precipiteerbare materiaal op. Een verklaring voor dit feit is dat in een nog verder via gelfiltratie gezuiverde fractie nuclease-activiteit is aangetoond (Polman, pers. mededeling).

### 3) Gelfiltratie met behulp van Sephadex G200

Een verdere stap ter zuivering van het LS-DNA was de filtratie van de in het bovenstaande besproken 0,9 M NaCl-fractie over Sephadex G200. De bedoeling van deze stap was in de eerste plaats na te gaan of het met behulp van gelfiltratie mogelijk zou zijn de  $^{14}\text{C}$ -gelabelde eiwitten, die tot nog toe het  $^3\text{H}$ -gelabelde materiaal begeleidden, te scheiden van het LS-DNA. In de tweede plaats was het de bedoeling het LS-DNA te bevrijden van de betrekkelijk grote hoeveelheden NaCl.

De gehele 0,9 M NaCl-fractie werd stijgend gefiltreerd over Sephadex G200 zoals weergegeven is in figuur 17. Het bleek dat er twee fracties waren met  $^3\text{H}$ -activiteit: een fractie die elueert op het volume waarop ook Dextran Blue elueert. Deze fractie, waarvan de radioactiviteit volledig met zuur precipiteerbaar is, ondervond dus geen vertraging bij het passeren van de kolom. De tweede fractie, waarvan de radioactiviteit niet met zuur pre-



Figuur 17: Gelfiltratie van LS-DNA over Sephadex G200.

Het 0,9 M NaCl-eluaat na DEAE-adsorptie van LS-DNA werd stijgend gefiltreerd over Sephadex G200, aan 0,01 M Tris-buffer, pH 7,5 geëquilibreerd. De diameter van de kolom was 2,5 cm, de hoogte 36 cm. Fracties van 5 ml werden opgevangen en de totale radioactiviteit daarin werd gemeten zoals beschreven is in hoofdstuk II.

●—● dpm  $^{14}\text{C}$       ○—○ dpm  $^3\text{H}$



precipiteerbaar is, elueert op hetzelfde volume als ethidiumbromide ( $M = 394$ ) en ondervindt dus vrijwel maximale vertraging bij het passeren van de kolom. Behoudens een zeer klein gedeelte gedraagt het  $^{14}\text{C}$ -gelabelde materiaal zich op dezelfde wijze als de eerste fractie van het  $^3\text{H}$ -gelabelde materiaal.

De conclusie van dit experiment moet dan ook zijn, dat het niet mogelijk is met behulp van gelfiltratie over Sephadex G200 het LS-DNA te scheiden van die eiwitten, die het nog begeleiden na behandeling met DEAE.

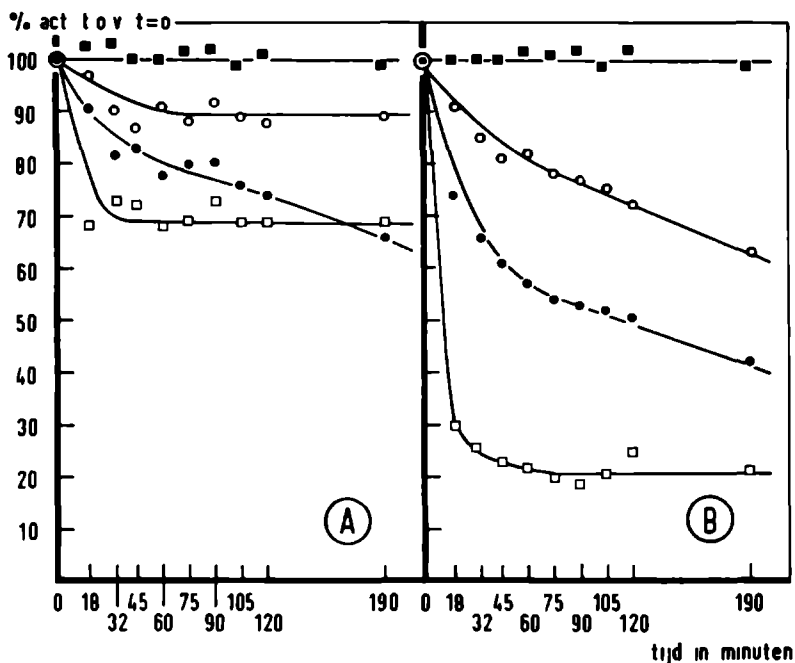
#### Karakterisering van het LS-DNA met behulp van enzymatische afbraak

Ten einde meer inzicht te verkrijgen in de aard van het LS-DNA is de werking van DNAse en pronase nagegaan op de boven beschreven, via DEAE en Sephadex G200 behandelde, LS-DNA-fractie.

Aan 4 ml gezuiverd LS-DNA werd al of niet DNAse of pronase toegevoegd en het mengsel werd geïncubeerd bij  $37^\circ\text{C}$ ; tevens werd een blanco-incubatie bij  $0^\circ\text{C}$  uitgevoerd. Op gezette tijden werd 0,2 ml van het mengsel genomen en de met zuur precipiteerbare radioactiviteit daarin gemeten zoals beschreven is in hoofdstuk II. Het resultaat van dit experiment is getoond in figuur 18, waarin het gedrag van het  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -gelabelde materiaal apart is weergegeven (respectievelijk figuur 18A en 18B).

Blijkens figuur 18A heeft de incubatie bij  $0^\circ\text{C}$  geen noemenswaardig gevolg voor de met zuur precipiteerbaarheid van het  $^3\text{H}$ -gelabeld materiaal. Blanco-incubatie bij  $37^\circ\text{C}$  daarentegen heeft tot gevolg, dat na 30 à 60 minuten 10% van de  $^3\text{H}$ -activiteit in zuur oplosbaar is geworden. Na deze tijd treedt geen verdere toename van de in zuur oplosbare  $^3\text{H}$ -activiteit op. Ook door incubatie met pronase wordt een deel van de  $^3\text{H}$ -activiteit in zuur oplosbaar; na ongeveer een uur is nog maar 70% van de oorspronkelijk aanwezige activiteit met zuur precipiteerbaar en ook nu neemt na deze tijd de in zuur oplosbare activiteit niet meer toe. Bij incubatie met DNAse treedt er een gestage degradatie van het  $^3\text{H}$ -gelabelde materiaal op; na 190 minuten lijkt deze afbraak nog niet ten einde te zijn.

Het effect van de verschillende incubaties op het  $^{14}\text{C}$ -gelabelde materiaal is



Figuur 18: Effect van DNase en pronase op het LS-DNA.

De samenstelling van de reactiemedia was als volgt:

- 1) 4 ml gezuiverd LS-DNA + 0,5 ml 0,01 M Tris-HCl, pH 7,5
- 2) 4 ml gezuiverd LS-DNA + 0,5 ml 0,1 N NaOH-NaAc-buffer, pH 5,5
- 3) 4 ml gezuiverd LS-DNA + 0,5 ml DNase (1 mg DNase per ml 0,1 N NaOH-NaAc, 0,02 M MgAc, pH 5,5)
- 4) 4 ml gezuiverd LS-DNA + 0,5 ml pronase (1 mg pronase per ml 0,01 M Tris-HCl, pH 7,5; voor gebruik 60 minuten geïncubeerd bij 37°C).

Behalve no. 1, die in ijs werd gehouden, werden de mengsels geïncubeerd bij 37°C. Op de aangegeven tijdstippen werd in een gedeelte van het reactiemengsel de met zuur precipiteerbare radioactiviteit gemeten zoals beschreven is in hoofdstuk II. De afname van de met zuur precipiteerbare radioactiviteit ten opzichte van  $t = 0$  is voor de  $^3\text{H}$ -activiteit (A) en de  $^{14}\text{C}$ -activiteit (B) apart weergegeven.

—●— blanco 0°C      —●— DNase  
 —○— blanco 37°C      —□— pronase

als volgt. Bij  $0^{\circ}\text{C}$  wordt niets van het  $^{14}\text{C}$ -gelabelde matariaal afgebroken, terwijl incubatie bij  $37^{\circ}\text{C}$  een gestage en betrekkelijk snelle degradatie tot gevolg heeft, die na 190 minuten nog niet afgelopen lijkt te zijn. Het effect van pronase is zeer duidelijk: reeds na ongeveer 60 minuten is nog maar 20% van de  $^{14}\text{C}$ -activiteit zuurprecipiteerbaar, maar na die tijd treedt geen verdere toename van het in zuur oplosbaar matariaal op. Ook onder invloed van DNase vindt afbraak van  $^{14}\text{C}$ -gelabeld matariaal plaats.

De toename van het in zuur oplosbare matariaal onder invloed van pronase vertoont hetzelfde patroon voor het  $^3\text{H}$ -gelabelde matariaal als voor het  $^{14}\text{C}$ -gelabelde. Dit houdt in dat door de afbraak van eiwitten - aangenomen wordt dat pronase uitsluitend eiwitten afbreekt - een bepaald gedeelte van de met zuur precipiteerbare  $^3\text{H}$ -activiteit in zuur oplosbaar wordt. Uit dit experiment kan niet opgemaakt worden of het hier wellicht  $^3\text{H}$ -activiteit betreft die verbonden is aan niet in DNA ingebouwd TdR (of derivaten daarvan) dat aspecifiek aan eiwitten geadsorbeerd is. Mogelijk is ook dat het hier gaat om zeer kleine stukjes DNA die of rechtstreeks of via een andere stof aan eiwit gebonden zijn en na afbraak van het eiwit niet meer met zuur precipiteerbaar zijn.

Ook het effect van DNase vertoont een gelijkvormig patroon op de  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -activiteit: door de afbraak van DNA wordt een bepaald gedeelte van de  $^{14}\text{C}$ -activiteit in zuur oplosbaar en het is niet op te maken of het hier gaat om op zichzelf niet met zuur precipiteerbare proteïnen die aan DNA verbonden waren of om aan DNA op de een of andere wijze geadsorbeerde aminozuren.

Opvallend is dat bij pronase-incubatie blijkbaar veel eiwit moet worden afgebroken om weinig  $^3\text{H}$ -activiteit in zuur oplosbaar te maken, terwijl bij DNase-incubatie weinig DNA hoeft te worden afgebroken om veel  $^{14}\text{C}$ -activiteit in zuur oplosbaar te maken. Deze relatie is weliswaar geen bewijs, maar toch een indicatie dat het hier niet gaat om geadsorbeerde, gelabelde precursors voor DNA en eiwit, maar om in respectievelijk in DNA en eiwit geïncorporeerde  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -activiteit.

Het in zuur oplosbaar worden van  $^3\text{H}$ - en  $^{14}\text{C}$ -activiteit bij incubatie van de LS-DNA-fractie zonder extra enzymen bij  $37^{\circ}\text{C}$  moet worden toegeschreven aan nog

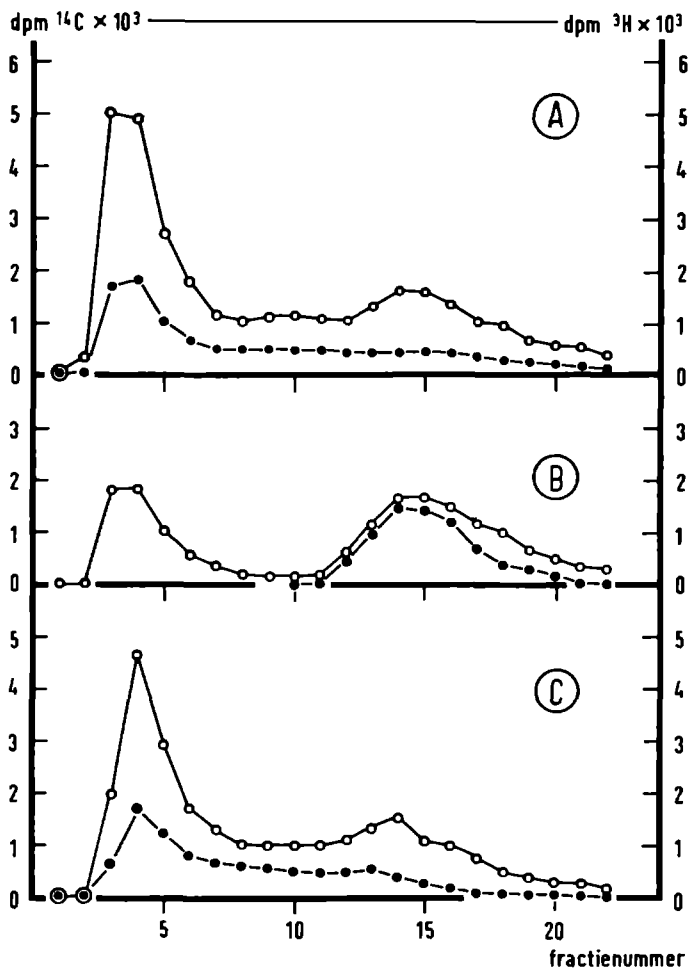
in het preparaat aanwezige nucleasen en proteolytische enzymen. Of en in hoeverre de nog in het preparaat aanwezige nucleasen en proteolytische enzymen betere mogelijkheden krijgen voor hun activiteit door de toevoeging van extra pronase respectievelijk DNase, valt uit het gepresenteerde experiment niet op te maken.

#### Eigenschappen van LS-DNA na pronase-behandeling

Met de bedoeling na te gaan of en in hoeverre de eigenschappen van het  $^3\text{H}$ -gelabeld materiaal dat met zuur precipiteerbaar blijft na pronase-behandeling veranderen, is van een volgend experiment de 0,9 M NaCl-fractie onderworpen aan pronase-digestie en van de reactieproducten is de dichtheid bepaald met behulp van CsCl-gradiënt centrifugatie, de sedimentatiesnelheid en het gedrag tijdens gelfiltratie over Sephadex G200. Ter vergelijking is een even groot gedeelte van de 0,9 M NaCl-fractie aan eenzelfde behandeling onderworpen na DNase-behandeling en na blanco-incubatie bij  $37^\circ\text{C}$ .

Het gedrag van de reactieproducten tijdens de gelfiltratie is weergegeven in figuur 19, waarin de totale radioactiviteit van de geëluëerde fracties is weergegeven. Het blijkt dat in dit experiment, na pronase-behandeling van de 0,9 M NaCl-fractie, alle  $^{14}\text{C}$ -gelabeld materiaal laagmoleculair geworden is, terwijl van het oorspronkelijke hoogmoleculaire  $^3\text{H}$ -gelabelde materiaal nog slechts ongeveer 40% hoogmoleculair is. Het laagmoleculair materiaal bleek niet met zuur precipiteerbaar te zijn. Na DNase-behandeling bleek nog ongeveer 70% van het  $^3\text{H}$ -gelabeld materiaal hoogmoleculair te zijn terwijl van het  $^{14}\text{C}$ -gelabelde materiaal nog ongeveer 80% hoogmoleculair was. Ook hier is de radioactiviteit in de kleine laagmoleculaire piek niet met zuur precipiteerbaar. Het belangrijkste resultaat van deze analyse is dat het  $^3\text{H}$ -gelabelde materiaal, dat na pronase-behandeling nog met zuur precipiteerbaar is, geen verandering heeft ondergaan wat betreft het gedrag tijdens gelfiltratie over Sephadex G200.

Na saccharose-gradiënt centrifugatie van de reactieproducten volgens de procedure die beschreven is in hoofdstuk III, bleek dat in alle drie de gevallen de met zuur precipiteerbare radioactiviteit zich boven in de gradiënt bevond.



Figuur 19: Gelfiltratie over Sephadex G200 van met pronase en DNase behandeld LS-DNA.

De samenstelling van de reactiemengsels was als volgt:

- A) 13 ml LS-DNA + 1,3 ml  $\text{H}_2\text{O}$
- B) 13 ml LS-DNA + 1,3 ml pronase (zie fig. 18)
- C) 13 ml LS-DNA + 1,3 ml DNase (zie fig. 18)

De mengsels werden geïncubeerd bij  $37^\circ\text{C}$  gedurende 60 minuten. De reactie werd gestopt door afkoelen tot  $0^\circ\text{C}$ . Het zo verkregen mengsel werd gefiltreerd over Sephadex G200 als beschreven in figuur 17. De totale radioactiviteit in de fracties werd gemeten zoals beschreven is in hoofdstuk II.

●—●  $\text{dpm } ^{14}\text{C}$     ○—○  $\text{dpm } ^3\text{H}$

Hetzelfde was het geval na CsCl-gradiënt centrifugatie.

De conclusie die uit dit experiment kan worden getrokken is dat door afbraak van eiwitten in het LS-DNA-preparaat de eigenschappen van het nog met zuur precipiteerbare,  $^3\text{H}$ -gelabelde materiaal, wat betreft gedrag tijdens gelfiltratie, dichtheid en sedimentatiesnelheid niet veranderen. Vooral het feit dat na pronase-digestie van eiwitten de dichtheid van het resterende, met zuur precipiteerbare materiaal niet gelijk wordt aan die van gewoon Physarum-DNA, duidt aan dat we ook nu niet met zuiver DNA te doen hebben.

Bij een experiment waarin in plaats van met  $^3\text{H}$ -TdR met  $^3\text{H}$ -AdR pulse-gelabeld werd, werd eveneens het LS-DNA  $^3\text{H}$  gelabeld. Het gedrag van de  $^3\text{H}$ -activiteit van het LS-DNA tijdens DEAE-behandeling en gelfiltratie en de gevoeligheid voor pronase en DNase was hetzelfde als wanneer gelabeld was met  $^3\text{H}$ -TdR.

### C. Discussie

Het voornaamste doel van de in dit hoofdstuk beschreven experimenten was te achterhalen of het LS-DNA - al of niet mede - inderdaad uit DNA bestaat. De daartoe uitgevoerde behandeling van het LS-DNA met DNase heeft geen resultaat opgeleverd waaruit dit onomstotelijk bewezen kan worden. Weliswaar bleek een deel van de  $^3\text{H}$ -activiteit in zuur oplosbaar te worden in de aanwezigheid van DNase, het grootste gedeelte van de  $^3\text{H}$ -activiteit bleef echter met zuur precipiteerbaar. Daar echter alle met zuur precipiteerbare radioactiviteit van het LS-DNA aan thymine gebonden is, lijkt het gerechtvaardigd te veronderstellen dat het niet met DNase te degraderen gedeelte van de  $^3\text{H}$ -activiteit gebonden moet zijn aan DNA dat op zodanige wijze gebonden is aan de een of andere stof, dat het niet of zeer moeilijk voor DNase toegankelijk is.

Na pronase-behandeling van het LS-DNA is de zweefdichtheid, de sedimentatiesnelheid en het gedrag tijdens gelfiltratie van het nog met zuur precipiteerbare  $^3\text{H}$ -gelabelde materiaal niet veranderd. Daarom zijn de van het gewoon Physarum-DNA afwijkende eigenschappen van het LS-DNA zeer waarschijnlijk niet toe te schrijven aan eventueel aan DNA gebonden eiwit. Merkwaardig is evenwel dat eiwitafbraak door pronase tot gevolg heeft, dat een groot gedeelte van de  $^3\text{H}$ -acti-

teit in zuur oplosbaar wordt. Wanneer aangenomen wordt dat de  $^3\text{H}$ -activiteit in het LS-DNA aan DNA gebonden is, dan kan dit alleen verklaard worden door aan te nemen dat het hier om zeer kleine stukjes DNA gaat die op zichzelf niet met zuur precipiteerbaar zijn, en niet - of niet meer - aan die andere stof gebonden zijn, die verantwoordelijk is voor de lage zweef dichtheid, de geringe sedimentatiesnelheid en het gedrag tijdens gelfiltratie.

Het is niet mogelijk door deze gegevens een duidelijk beeld te krijgen over de structuur van het LS-DNA. Het enige dat gezegd kan worden is, dat het LS-DNA waarschijnlijk bestaat uit DNA dat gebonden is aan eiwit en nog een andere stof, waarbij die andere onbekende stof verantwoordelijk is voor de van het gewoon Physarum-DNA afwijkende eigenschappen.

A. Aangezien speciaal voor net in dit proefschrift beschreven onderzoek de cultuur van Physarum polycephalum ter hand werd genomen, zijn in hoofdstuk III verschillende literatuurgegevens over de DNA-synthese in het macroplasmodium van Physarum polycephalum nagegaan.

De drie reeds bekende DNA-fracties: het chromosomaal, het mitochondriaal en het nucleolair DNA werden ook in onze cultuur aangetoond. Tevens bleek ook in onze cultuur het chromosomaal DNA voornamelijk gesynthetiseerd te worden tijdens de eerste twee uur volgend op de mitose, de S-fase, terwijl het mitochondriaal en het nucleolair DNA voornamelijk gedurende de G2-fase gesynthetiseerd werden. Of er al dan niet synthese van mitochondriaal en nucleolair DNA optrad tijdens de S-fase kon uit de gepresenteerde experimenten niet opgemaakt worden.

Naast de drie genoemde DNA-fracties werd nog een vierde met zuur precipiteerbare en met TdR te labelen fractie aangetroffen. Deze fractie had een zeer lage zweefwicht en een zeer geringe sedimentatiesnelheid. In ieder geval kon worden aangetoond dat deze fractie, het LS-DNA, in de G2-fase gesynthetiseerd werd.

B. In hoofdstuk IV is beschreven hoe gepoogd is door middel van sedimentatie-analyse van replicerend DNA inzicht te krijgen in het mechanisme van DNA-replicatie.

Na pulse-labeling van 4 minuten in de S-fase werd het plasmodium gelyceerd en het lysaat over een lineaire saccharose-gradiënt gecentrifugeerd. Het bleek dat een gedeelte van het DNA sneller sedimenteerde dan de rest van het DNA en dat dit gedeelte een 4 à 5 maal hogere specifieke activiteit had dan de rest van het DNA. Werd de labelperiode verlengd, dan werd na 20 à 30 minuten de specifieke activiteit over de hele gradiënt hetzelfde. Dit laatste werd als een aanwijzing beschouwd dat deze snel sedimenterende fractie wellicht replicerend DNA zou bevatten. De scheiding tussen dit sneller sedimenterend gedeelte en de rest van het DNA was echter niet goed genoeg om door middel van bijvoorbeeld pulse-chase-experimenten definitief aan te tonen dat de gevonden fractie replicerend DNA is.



C. Het effect van cycloheximide op de synthese van chromosomaal, mitochondriaal en nucleolair DNA is beschreven in hoofdstuk V.

Toediening aan een plasmodium van cycloheximide in een concentratie van 50  $\mu\text{M}$  gedurende de S-fase, resulteerde in een remming van de incorporatie van  $^3\text{H}$ -TdR in het chromosomaal DNA van ongeveer 90%.

Cycloheximide had slechts een gering effect op de incorporatie van  $^3\text{H}$ -TdR in mitochondriaal en nucleolair DNA gedurende de G2-fase.

Door deze resultaten wordt het vermoeden gewekt dat alleen de synthese van chromosomaal DNA afhankelijk is van gelijktijdig optredende cytoplasmatische eiwitsynthese.

D. In hoofdstuk VI zijn enige biologische experimenten beschreven omtrent het LS-DNA. De resultaten zijn de volgende.

- 1) Gedurende de hele G2-fase treedt synthese van LS-DNA op, maar gedurende de laatste twee uur voor de mitose is de synthese van LS-DNA maximaal.
- 2) Eenmaal gevormd, blijft het LS-DNA gedurende de volgende kerncyclus dezelfde sedimentatie-eigenschappen behouden.
- 3) In aanwezigheid van cycloheximide in het medium tot een concentratie van 50  $\mu\text{M}$  wordt de incorporatie van  $^3\text{H}$ -TdR in het LS-DNA sterk geremd.
- 4) In aanwezigheid van ethidiumbromide in het medium tot een concentratie van 20  $\mu\text{M}$  wordt de incorporatie van  $^3\text{H}$ -TdR in het LS-DNA niet noemenswaardig geremd. Dit DNA heeft dus waarschijnlijk geen circulaire structuur.

E. Pogingen tot biochemische karakterisering van het LS-DNA zijn beschreven in hoofdstuk VII.

- 1) Na hydrolyse van het LS-DNA en papierchromatografie van het hydrolysaat bleek dat de na labeling met  $^3\text{H}$ -TdR aan het LS-DNA verbonden  $^3\text{H}$ -activiteit alleen aan thymine verbonden was.
- 2) Werd na voorafgaande scheiding van het LS-DNA van het overige Physarum-DNA door middel van zone-gradient centrifugatie het LS-DNA behandeld met DEAE-cellulose, dan gedroeg het LS-DNA zich als via fenolextractie gezuiverd

Physarum-DNA.

- 3) Bij gelfiltratie van het met DEAE behandeld LS-DNA over Sephadex G200 bleek dat het LS-DNA geen vertraging ondervond bij de passage van de kolom.
- 4) Werd gezuiverd, met  $^3\text{H}$ -TdR gelabeld, LS-DNA geïncubeerd met DNase dan trad er een geleidelijke afname van de met zuur precipiteerbare  $^3\text{H}$ -activiteit op. Tevens werd een deel van in het LS-DNA aanwezig eiwit in zuur oplosbaar.
- 5) Incubatie van met  $^3\text{H}$ -TdR gelabeld LS-DNA met pronase had tot resultaat dat naast een snelle afbraak van eiwit een betrekkelijk snelle afname van de met zuur precipiteerbare  $^3\text{H}$ -activiteit optrad.
- 6) Na behandeling van met  $^3\text{H}$ -TdR gelabeld LS-DNA met pronase bleek dat de sedimentatie-eigenschappen, het gedrag bij gelfiltratie over Sephadex G200 en de zweefdichtheid van de nog met zuur precipiteerbare  $^3\text{H}$ -activiteit niet veranderd waren.
- 7) Uit de voorgaande resultaten wordt de conclusie getrokken dat LS-DNA bestaat uit DNA, eiwit en nog een of meerdere andere stoffen, die met elkaar via een in ieder geval Sarkosyl-resistente band verbonden zijn. Die onbekende andere stof wordt verondersteld verantwoordelijk te zijn voor het sedimentatiegedrag en de lage zweefdichtheid van het LS-DNA.

## SUMMARY

A. Since the culture of the slime mold Physarum polycephalum was started in our laboratory at the beginning of this investigation, known data on DNA synthesis in macroplasmodia of this species had to be checked.

The three known fractions (mitochondrial, nucleolar and chromosomal) were demonstrable in our cultures. Also, as found in other research, chromosomal DNA was synthesized nearly exclusively during a period of two hours immediately following mitosis, whereas mitochondrial and nucleolar DNA were synthesized primarily during G2 phase. Whether or not additional synthesis of mitochondrial and nucleolar DNA occurred during S phase is not conclusively demonstrated in the present experiments.

In addition to these three DNA fractions another one is found which labeled with  $^3\text{H}$ -TdR and precipitated with FCA (= LS-DNA). This fraction exhibits a very low density in a CsCl gradient and a very low sedimentation velocity in a saccharose gradient. LS-DNA was synthesized during the G2 phase.

B. Chapter IV describes an attempt to gain insight into the mechanism of DNA replication by means of sedimentation analysis of replicating DNA.

After pulse labeling for 4 minutes during S phase, plasmodia are lysed and the lysate centrifuged over a linear saccharose gradient. One fraction of DNA exhibits a higher sedimentation velocity than the rest and its specific activity is 4 to 5 times higher. After a labeling period of 20 to 30 minutes the specific activity is the same over the entire gradient. This result is considered to indicate that the fast sedimenting fraction contains the replicating part of the genome. However, the separation of this fast sedimenting fraction from the rest of the DNA is very poor. Therefore it is not possible to get a strict proof that this fast sedimenting part exclusively contains the replicating part of the genome.

C. The differences in effect of cycloheximide on the synthesis of chromosomal, mitochondrial and nucleolar DNA is described in chapter V.

Exposure of macroplasmidia to 50  $\mu$ M cycloheximide during the S phase strongly suppresses the labeling of the chromosomal DNA, whereas incorporation of  $^3\text{H}$ -TdR into mitochondrial and nucleolar DNA is only slightly affected by the inhibitor. The results suggest that only synthesis of chromosomal DNA requires concomitant cytoplasmic protein formation.

D. In chapter VI biological experiments with LS-DNA are described. The results are summarised as follows.

- 1) Some synthesis of LS-DNA occurs during the entire G2 phase, but the greater part of the LS-DNA is synthesised during a period of about two hours immediately preceding mitosis.
- 2) Once formed, sedimentation properties of LS-DNA do not change during the following mitotic cycle.
- 3) Incorporation of  $^3\text{H}$ -TdR in LS-DNA is strongly suppressed by the presence of cycloheximide in the growth medium at a concentration of 50  $\mu$ M.
- 4) Incorporation of  $^3\text{H}$ -TdR in LS-DNA is not affected by the presence of ethidium bromide in the medium at a concentration of 20  $\mu$ M. Therefore the LS-DNA is presumably not a circular molecule.

E. Some attempts to characterise the LS-DNA biochemically are described in chapter VII.

- 1) After hydrolysis of  $^3\text{H}$ -TdR labeled LS-DNA, paper chromatography of the reaction products reveals that only thymine is radioactive.
- 2) After separating LS-DNA from heavier DNA by means of zone gradient centrifugation, and treating with DEAE cellulose, this molecule exhibits the same affinity for DEAE cellulose as Physarum DNA purified by phenol extraction.
- 3) Gel filtration of LS-DNA over Sephadex G200 after treatment with DEAE-cellulose reveals that the molecule is too large to be trapped by Sephadex G200.

- 4) During incubating purified  $^3\text{H}$ -TdR-LS-DNA with DNase, gradual decrease of  $^3\text{H}$  activity in acid insoluble material was observed; at the same time some of the protein in LS-DNA became acid soluble.
- 5) Incubation of  $^3\text{H}$ -TdR labeled LS-DNA after purification with pronase resulted in a rapid degradation of protein. Also a substantial decrease of  $^3\text{H}$  activity occurred in acid precipitable material.
- 6) No change in properties of LS-DNA remaining after treatment with pronase was detectable with respect to sedimentation velocity, gel filtration over Sephadex G200 and density.
- 7) From the results presented it is tentatively concluded that the material originally named LS-DNA actually consists of DNA, protein and one or more other components linked together with a Sarkosyl resistant bond. The one or more unknown components are imagined to be responsible for the low sedimentation velocity and the low density of the LS-DNA. In view of the gel filtration, the low sedimentation velocity does not necessarily suggest that LS-DNA is a small molecule.



# LITERATUUR

- BAUER, W., VINOGRAD, J. J.Mol.Biol. 33, 141-171, 1968.
- BEN PORAT, T., STERE, A., KAPLAN, A.S. Biochim.Biophys.Acta 61, 150-152, 1962.
- BERGER, H., IRVIN, J.L. Proc.N.A.S. 65, 152-159, 1970.
- BRAUN, R., BEHRENS, K. Biochim.Biophys.Acta 195, 87-98, 1969.
- BRAUN, R., EVANS, T.E. Biochim.Biophys.Acta 182, 511-522, 1969.
- BRAUN, R., MITTERMAYER, G., RUSCH, H.P. Proc.N.A.S. 53, 942-931, 1965.
- BRAUN, R., MITTERMAYER, G., RUSCH, H.P. Biochim.Biophys.Acta 114, 527-535, 1966.
- BRAUN, R., RUEDI-WILLI, H. Experientia 27, 1142, 1971.
- BRAUN, R., WILLI, H. Biochim.Biophys.Acta 174, 246-252, 1969.
- BREWER, E.N. J.Mol.Biol. 68, 401-412, 1972.
- BURTON, K. Biochem.J. 62, 315-323, 1956.
- COMINGS, D.E., KAKEFUDA, T. J.Mol.Biol. 33, 225-229, 1968.
- COMINGS, D.E., OKADA, T.A. J.Mol.Biol. 75, 609-618, 1973.
- CUMMINS, L.E. in: The Cell Cycle: Gene-Enzyme Interactions (ed.: G. Padilla, G. Witson, I. Cameron). Academic Press, New York, 1968, pag. 141-158.
- CUMMINS, J.E., BREWER, E.N., RUSCH, H.P. J.Cell Biol. 27, 337-341, 1965.
- CUMMINS, J.E. RUSCH, H.P. J.Cell Biol. 31, 577-583, 1966.
- CUMMINS, J.E., WEISFELD, G.E., RUSCH, H.P. Biochim.Biophys.Acta 129, 240-248, 1966.
- DANIEL, J.W., BALDWIN, H.H. in: Methods in Cell Physiology (ed.: D.M. Prescott) vol. I. Academic Press, New York, 1964, pag. 9-42.
- ERLANDSON, R.A., DE HARVEN, E. J.Cell Science 8, 353-397, 1971.
- FAKAN, S., TURNER, G.N., PAGANO, J.S., HANCOCK, R. Proc.N.A.S. 69, 2300-2305, 1972.
- FRIEDMAN, D.L., MUELLER, G.C. Biochim.Biophys.Acta 174, 253-263, 1969.
- FUJISAWA, K., MAKINO, K. in: Papierchromatographie in der Botanik (ed.: H.F. Lins-kens) Springer Verlag, Berlin, 1959, pag. 198-212.

GOLDRING, E.S., GROSSMAN, L.J., KRUPNIC, D., CRYER, D.R., MARMUR, J. J.Mol.Biol.

52, 323-335, 1970.

GROSSMAN, L.J., GOLDRING, E.S., MARMUR, J. J.Mol.Biol. 46, 367-376, 1969.

GUTES, E., GUTES, S. in: Methods in Cell Physiology (ed.: D.M. Prescott),  
vol. I, Academic Press, New York, 1964, pag. 43-54.

GUTES, E., GUTES, S. J.Cell Biol. 43, 229-236, 1969.

GUTES, E.W., HANAWALT, P.C., GUTES, S. Biochim.Biophys.Acta 142, 181-194, 1967.

GUTES, E., GUTES, S., RUSCH, H.P. Developm.Biol. 3, 588-614, 1961.

HABENER, J.F., BYNUM, B.S., SHACK, J. Biochim.Biophys.Acta 195, 484-493, 1969.

HANAOKA, F., YAMADA, M. Biochem.Biophys.Res.Comm. 42, 647-653, 1971.

HARRISON, P.R. European J.Biochem. 19, 309-315, 1971.

HOLLENBERG, C.P., BORST, P., VAN BRUGGEN, E.F.J. Biochim.Biophys.Acta 209, 1-15,  
1970.

HOLUBEK, V. Analyt.Biochem. 18, 375-378, 1967.

HOLT, C.E., GURNEY, E.G. J.Cell Biol. 40, 484-496, 1969.

HORWITZ, H.B., HOLT, C.E. J.Cell Biol. 49, 546-553, 1971.

HUBERMAN, J.A., TSAI, A., DEICK, R.A. Nature 241, 32-36, 1973.

HUTTERMANN, A., PORTER, M.T., RUSCH, H.P. Arch.Mikrobiol. 74, 90-100, 1970.

KAY, R.R., HAINES, M.E., JOHNSTON, J.R. FEBS Letters 16, 233-236, 1971.

LEIBOWITZ, R. Ph.D. Thesis. Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, U.S.A.,  
1970.

LEVIS, A.G., KRSMANOVIC, V., MILLER-FAURES, A., ERRERA, M. European J.Biochem. 3,  
57-69, 1967.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. J.Biol.Chem. 193, 265-275,  
1951.

MCKEEHAN, W., HARDESTY, B. Biochem.Biophys.Res.Comm. 36, 625-630, 1969.

MITTERMAYER, C., BRAUN, R., CHAYKA, T.G., RUSCH, H.P. Nature 210, 1133-1137, 1966.



MITTERMAYER, C., BRAUN, R., RUSCH, H.P. Biochim.Biophys.Acta 91, 399-405, 1964.

MIZUNO, N.S., STOOPS, C.E., PEIFFER, jr., R.L. J.Mol.Biol. 59, 517-525, 1971A.

MIZUNO, N.S., STOOPS, C.E., PEIFFER, jr., R.L. Nature 229, 22-24, 1971B.

MOORE, D.H. in: Physical Techniques in Biological Research IIB. Academic Press, New York, 1969, pag. 285-313.

MULDOON, J.J., EVANS, T.E., NYGAARD, O.F. Biochim.Biophys.Acta 247, 310-321, 1971.

NASS, M.M.K. Exptl.Cell Res. 72, 211-222, 1972.

NYGAARD, O.F., GUTTES, S., RUSCH, H.P. Biochim.Biophys.Acta 38, 298-306, 1960.

O'BRIEN, R.L., SANYAL, A.B., STANTON, R.H. Exptl.Cell Res. 70, 106-112, 1972.

OCKEY, C.A., Exptl.Cell Res. 70, 203-213, 1972.

OPPENHEIM, A., KATZIR, N. Exptl.Cell Res. 68, 224-226, 1971.

PAOLETTI, G., DUTHEILLET-LAMONTHAZIE, N., JEANTEUR, Ph., OBRENOVITCH, A. Biochim. Biophys.Acta 149, 435-450, 1967.

PEARSON, G.D., HANAWALT, P.C. J.Mol.Biol. 62, 65-80, 1971.

PROBST, H. Z.Physiol.Chem. 351, 163-168, 1970.

PROBST, H. Z.Physiol.Chem. 352, 748-756, 1971.

RADLOFF, R., BAUER, W., VINOGRAD, J. Proc.N.A.S. 57, 1514-1521, 1967.

RAO, B., GONTCHAROFF, N. Exptl.Cell Res. 56, 269-274, 1969.

RUSCH, H.P. Fed.Proc. 28, 1761-1770, 1969.

RUSCH, H.P. Adv.Cell Biol. 1, 297-320, 1970.

SACHSENMAIER, W. Biochem.Z. 340, 541-547, 1964.

SACHSENMAIER, W. Materia Medica Nordmark 20, 596-607, 1968.

SACHSENMAIER, W., IVES, D.H. Biochem.Z. 343, 399-406, 1965.

SATO, S., TANAKA, M., SUGIMURA, T.T. Biochim.Biophys.Acta 209, 43-48, 1970.

SCHANDL, E.K., TAYLOR, J.H. Biochem.Biophys.Res.Comm. 34, 291-300, 1969.

SIEGEL, M.R., SISLER, H.D. Biochim.Biophys.Acta 87, 83-89, 1964.

SOLAO, P.B., SHALL, S. Exptl.Cell Res. 69, 295-300, 1971.

SONENSHEIN, G.E., HOLT, C.E. Biochem.Biophys.Res.Comm. 33, 361-367, 1968.

TREMBLAY, G.J., DANIELS, M.J., SCHAECHTER, M. J.Mol.Biol. 40, 65-76, 1969.

WANKA, F., MOORS, J. Biochem.Biophys.Res.Comm. 41, 85-90, 1970.

WANKA, F., VEREIJKEN, P.H., WEIJERS, W., AELEN, J.M.A. Proc.Koninkl.Acad.Wetensch. 75C, 441-448, 1972A.

WANKA, F., MOORS, J., KRIJZER, F.N.C.M. Biochim.Biophys.Acta 269, 151-161, 1972B.

WILLIAMS, C.A., OCKEY, C.H. Exptl.Cell Res. 63, 365-372, 1970.

ZELLMEGER, A., RYSER, U., BRAUN, R. J.Mol.Biol. 64, 681-691, 1972.

Curriculum vitae:

Geboren: 6 April 1943 te Heerlen

Lagere School: September 1950 - September 1956 te Spekholzerheide-Kerkrade

Middelbare School: September 1956 - September 1962 te Heerlen

Gymnasium  $\beta$ , St. Bernardinuscollege

Universitaire Opleiding: September 1962 - April 1969 te Nijmegen

Biologie, Katholieke Universiteit

Kandidaatsexamen: April 1966, cum laude

Doctoraalexamen: April 1969, cum laude

Bijvakken: Plantenfysiologie (zelf-incompatibiliteit bij Petunia) en Genetica (haemoglobine-onderzoek bij muizen)

Hoofdvak: Chemische Cytologie

a) Radioactieve labeling van DNA in synchrone culturen van Chlorella pyrenoidosa (Nijmegen)

b) Bepaling polynucleotide-ligase-activiteit in E. coli (Medisch-Biologisch Laboratorium RVO/TNO, Rijswijk)

Postdoctoraal: Mei 1969 - September 1973 te Nijmegen

Wetenschappelijk medewerker van Dr. F. Wanka (Z.W.O.)

Researchonderwerp: DNA-synthese in Physarum polycephalum

Onderwijstaak: Assistentie bij het opzetten en geven van prekandidaatspractica in Celbiochemie en Moleculaire

Biologie







# STELLINGEN

## I

Het begrip "celcyclus" is niet van toepassing op de gebeurtenissen in het plasmodium van *Physarum polycephalum*.

## II

In ongeveer 60% van de tijdschriften op biologisch, medisch en chemisch terrein wordt in de inhoudsopgave de naam van de auteur(s) sterker benadrukt dan de titel van het betreffende artikel.

## III

Het is mogelijk de verschijnselen die Koch en medewerkers er toe gebracht hebben een "communication DNA" te veronderstellen te verklaren als artefacten.

Koch, J., Von Pfeil, H., *FEBS Letters* 17, 312-314, 19

Koch, J., Götz, D., *FEBS Letters* 27, 9-12, 1972.

## IV

Het is ontoelaatbaar dat in het huidige onderwijs van de veronderstelling wordt uitgegaan dat het kunnen oplossen van bestaande problemen impliceert dat men ook probleemgevoelig is.

## V

De conclusie van Linskens dat het effect van röntgenstralen op de incompatibiliteitsreactie berust op een biochemische verandering van het cellulaire immuniteitsmechanisme en niet vergeleken kan worden met dat van mutagene straling is aanvechtbaar.

Linskens, H.F., Schrauwen, J.A.M., van der Donk, M., *Naturwissenschaften* 23, 547, 1960.





## VI

Het is niet zeker dat de door Braun en Behrens waargenomen stapsgewijze toename van RNAse I activiteit in plasmodia en kweekmedium van *Physarum polycephalum* berust op enzymsynthese de novo.

Braun, R., Behrens, K., *Biochim.Biophys.Acta*  
195, 87-98, 1969.

## VII

Als naam voor het nieuwe talengebouw van onze universiteit is "Babbellab" om redenen van linguïstische aard verre te verkiezen boven "Erasmus-gebouw".

P.A.Th.J. Werry

Nijmegen, 14 september 1973



